

# Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors AATF

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
(Dr. rer. nat.)

der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

vorgelegt von  
Sven Burgdorf aus Genk (Belgien)

Bonn 2003

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtmann
2. Referent: Priv. Doz. Dr. Otto Traub

Tag der Promotion: \_\_\_\_\_

# Abkürzungsverzeichnis

AF	Transaktivierungsdomäne von Nuklearrezeptoren
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Nukleotid-Basenpaar
CC2	<i>Coiled-Coil</i> -Domäne von TSG101
cDNA	komplementäre DNA
CR	konservierter Bereich
Da	Dalton
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBD	DNA-Bindedomäne
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E2	Ubiquitin-Konjugierendes Enzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoll-bis( $\beta$ -Aminoethyläther) N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ER	Estrogenrezeptor
FCS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GR	Glucocorticoidrezeptor
His-Ubiquitin	mit einem 6-fachen Histidin-Epitop ausgestattetes Ubiquitin
IF	Intermediärfilamente
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thio-Galaktopyranoside
Kb	Kilobase
LBD	Ligandenbindedomäne
Luc	Luciferase
LX	LXXLL-Motiv
LZ	Leucin-Zipper
MR	Mineralocorticoidrezeptor
mRNA	Messenger-RNA

NEM	N-Ethyl-Maleinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NP-40	Nonidet P40
NR	Nuklearrezeptor
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykoll
PLP	phosphathaltiger Lysispuffer
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PR	Progesteronrezeptor
RAR/RXR	Retinsäurerezeptor
Rb	Retinoblastomprotein
RLU	relative Luciferaseaktivität
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAD	Transaktivierungsdomäne
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TR	Thyroidhormonrezeptor
U	Unit (Enzymeinheit)
Ub	Ubiquitin
Ubc-Region	Region mit höher Homologie zu Ubiquitin-Konjugierenden Enzymen
UbK48R	Ubiquitin-Mutante, in dem Lysin48 gegen Arginin ausgetauscht ist
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
Wt	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1.	AATF, ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt ist .....	1
1.2.	Die Transkriptionskontrolle: Nuklearrezeptoren als Modell der Transkriptionsregulation .....	3
1.3.	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	7
<b>2.</b>	<b>Material.....</b>	<b>8</b>
2.1.	Chemikalien und Enzyme .....	8
2.2.	Allgemeine Stammlösungen und Puffer .....	8
2.2.1.	Lösungen für die Analyse von DNA .....	8
2.2.2.	Lösungen für die Arbeit mit Proteinen .....	9
2.3.	Medien .....	10
2.3.1.	Medien für die Kultur von Bakterien.....	10
2.3.2.	Medien für die Kultur von Hefen .....	10
2.3.3.	Medien für die Kultur von Säugerzellen.....	12
2.4	Stämme und Zelllinien.....	12
2.4.1	Bakterienstämme .....	12
2.4.2	Hefestamm .....	12
2.4.3	Zelllinien .....	13
2.5	Plasmide .....	13
2.6	Oligonukleotide .....	14
2.7	Antikörper .....	15
<b>3.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>16</b>
3.1.	Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	16
3.1.1.	Restriktionsverdau .....	16
3.1.2.	Agarosegelelektrophorese.....	16
3.1.3.	Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	16
3.1.4.	Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	16
3.1.5.	Ligation .....	17

3.1.6.	Transformation von Bakterien.....	17
3.1.7.	Isolierung von Plasmiden aus Bakterien.....	17
3.1.8.	Isolierung von Gesamt-RNA und RT-PCR.....	18
3.1.9.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	18
3.2.	Das Zwei-Hybrid-System.....	20
3.2.1.	Transformation von Hefen .....	20
3.2.2.	Transformation von Hefen mit einer cDNA-Bank .....	21
3.2.3.	Aufschluß der Hefe-Zellwand und Isolierung der cDNA.....	22
3.3.	Proteinchemische Techniken.....	23
3.3.1.	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien.....	23
3.3.2.	<i>In vitro</i> -Transkription und Translation .....	23
3.3.3.	<i>In vitro</i> -Nachweis der Protein-Protein-Interaktionen .....	24
3.3.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	24
3.3.5.	Fluorographie .....	25
3.3.6.	Western Blot.....	26
3.4.	Zellkultur und immunhistochemische Techniken .....	26
3.4.1.	Kultur von Säugerzellen.....	26
3.4.2.	Transfektion von Säugerzellen.....	27
3.4.2.1.	Lipofektion .....	27
3.4.2.2.	Transfektion mittels Calcium-Phosphat.....	27
3.4.3.	Immunfluoreszenzfärbung .....	28
3.4.4.	Anfärbung der endosomalen und lysosomalen Strukturen .....	29
3.5.	Northern Blot.....	29
3.6.	Transiente Expressionsexperimente zur Untersuchung der Luciferaseaktivität .....	30
3.7.	<i>In vivo</i> -Nachweis von ubiquitinierten Proteinen .....	31
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
4.1.	Identifizierung neuer Interaktionspartner von AATF mit dem Zwei-Hybrid-System .....	33
4.2.	Kartierung der Interaktionsdomänen in AATF .....	36
4.3.	<i>In vitro</i> Bestätigung der Interaktionen von AATF mit den potentiellen Bindungspartnern.....	36
4.4.	Mns1 als potentieller Interaktionspartner von AATF.....	37

4.4.1.	Mns1, ein Mitglied der <i>Intermediate Filament</i> -Familie. ....	37
4.4.2.	RNA-Expressionsanalyse von Mns1 .....	38
4.4.3.	Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von Mns1 .....	39
4.5.	Pmf-1 als potentieller Interaktionspartner von AATF.....	41
4.5.1.	Pmf-1, ein Koaktivator von Nrf-2 .....	41
4.5.2.	Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von Pmf-1 .....	41
4.6.	AIP1 als Interaktionspartner von AATF.....	42
4.6.1.	AIP1, ein neues Protein mit Homologie zu einem Mitglied der RNA-Transportmaschinerie aus Hefe.....	42
4.6.2.	RNA-Expressionsanalyse von AIP1 .....	43
4.6.3.	Subzelluläre Lokalisierung von AIP1 .....	44
4.7.	TSG101 als Interaktionspartner von AATF.....	45
4.7.1.	TSG101, ein potentieller Tumorsuppressor .....	45
4.7.2.	Isolierung des gesamten kodierenden Bereichs von TSG101 aus der Ratte.....	47
4.7.3.	Kartierung der Interaktionsdomäne in TSG101 .....	49
4.7.4.	Immunfluoreszenzanalyse von TSG101 .....	50
4.7.5.	TSG101 stimuliert die AR-vermittelte Transkription.....	53
4.7.6.	Identifizierung von AATF als Koaktivator der AR-vermittelten Transkription .....	55
4.7.7.	AATF und TSG101 kooperieren in der Aktivierung der AR-vermittelten Transkription .....	57
4.7.8.	Die Ubc-Domäne und der C-terminale, $\alpha$ -helikale Bereich von TSG101 sind erforderlich für eine effiziente Koaktivierung der Transkription.....	58
4.7.9.	TSG101 aktiviert die AR-vermittelte Transkription durch die Regulierung des Ubiquitinierungszustandes .....	60
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>67</b>
5.1.	Identifizierung neuer Interaktionspartner von AATF.....	67
5.2.	Mns1 als potentieller Interaktionspartner von AATF.....	68
5.3.	Pmf-1 als potentieller Interaktionspartner von AATF.....	70
5.4.	AIP1 als Interaktionspartner von AATF.....	71
5.5.	TSG101 als Interaktionspartner von AATF.....	73
5.5.1.	AATF als Koaktivator der AR-vermittelten Transkription.....	75

5.5.2.	TSG101 steigert die transaktivierende Wirkung des AR durch die Stimulierung dessen Monoubiquitinierung .....	77
5.5.3.	Physiologische Bedeutung der aktivierenden Wirkung von AATF und TSG101 auf die AR-vermittelte Transkription .....	81
5.5.4.	Mögliche biologische Funktion von AATF .....	83
5.6.	Ausblick .....	84
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>87</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	
	Publikationen.....	I
	Danksagung.....	II
	Erklärung.....	III
	Lebenslauf .....	IV

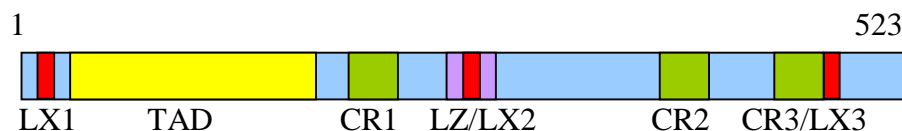


## 1. Einleitung

### 1.1. AATF, ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt ist

Der Transkriptionsfaktor AATF wurde erstmals als Interaktionspartner der Dlk/ZIP Kinase identifiziert (Page *et al.*, 1999). Die Dlk ist ein Mitglied der DAP-Kinase-Familie, das unter bestimmten Bedingungen Apoptose auslösen kann (Kögel *et al.*, 1999; Page *et al.*, 1999; Übersicht bei Kögel *et al.*, 2001). AATF wirkt diese Apoptose entgegen und wurde deswegen *Apoptosis Antagonizing Transcription Factor* genannt. Neuere Befunde zur Funktion der Dlk deuten auf eine Beteiligung an mitotischen Prozessen (Preuss *et al.*, 2003).

AATF ist ein konserviertes Protein mit Orthologen u.a. in Mensch, Maus, Sojabohne, Zebrafish und Hefe (Lindfors *et al.*, 2000). Das AATF aus der Ratte umfaßt 523 AS und zeigt nach Expression als GFP-Fusionsprotein eine diffuse Verteilung im Zellkern. Die Struktur des Proteins ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung von AATF aus der Ratte**

Die Transaktivierungsdomäne (TAD; AS 21-170) wurde gelb markiert, der Leucin-Zipper (LZ; AS 239-260) lila, die drei hochkonservierte Bereiche (CR1-3; AS 197-219, 421-440, 466-478) grün und die drei LXXLL-Motive (LX1-3; AS 11-15, 246-250, 483-487) rot.

An seinem N-Terminus besitzt AATF eine extrem saure Domäne. Dies ließ vermuten, daß AATF eine Funktion als Transkriptionsfaktor haben könnte. In der Tat zeigte AATF in einem GAL4-abhängigen Reporter-genversuch eine transaktivierende Wirkung in Hefe (Page *et al.*, 1999). Durch Deletionskartierung konnte die Transaktivierungsdomäne auf den sauren Bereich eingegrenzt werden (I. Lödige, Diplomarbeit 2000).

Des weiteren enthält AATF einen Leucin-Zipper, der u.a. für die Interaktion mit Dlk zuständig ist, und drei hochkonservierte Bereiche. Diese letzteren Sequenzblöcke haben eine Größe von 13 bis 23 AS und zeigen sogar mit dem Orthologen aus der Hefe eine Homologie von über 80 % (Lindfors *et al.*, 2000). Schließlich besitzt AATF drei LXXLL-Motive, welche charakteristisch für viele Koaktivatoren von Nuklearrezeptoren sind (Siehe 1.2.).

Für AATF aus der Maus, auch Traube genannt, wurde eine essentielle Rolle bei der frühen Embryogenese nachgewiesen. Die Generierung einer Knockout-Mutante von AATF erwies sich als embryonal letal mit dem Tag E 3,5 (Thomas *et al.*, 2000). Die Entwicklung des Embryos fand nicht über das Morulastadium hinaus statt. In diesem Entwicklungsstadium wird die bis dahin sehr kompakte Chromatinstruktur geöffnet und der Embryo entwickelt eine eigene Transkriptionssteuerung (Übersicht bei Latham, 1999). Thomas *et al.* mutmaßen, daß AATF an der Auflockerung der Chromatinstruktur beteiligt sein könnte. Zum Phänotyp der Mutante gehörten zusätzlich das Fehlen eines intakten Aktinfilamentsystems, ein deutlicher Mangel an Ribosomen, eine beeinträchtigte Zellteilung und die Anwesenheit stark vergrößerter sekretorischen Vesikel.

In einem anderen Ansatz wurde das humane AATF (hier Che-1 genannt) als Interaktionspartner der RNA-Polymerase II, Untereinheit 11, und des Retinoblastoma-Proteins Rb identifiziert (Fanciulli *et al.*, 2000). Rb spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus (Übersicht bei Harbour & Dean, 2000). Durch die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2F1 verhindert Rb den Übergang von der G1- in die S-Phase. Die sogenannte „*Pocket Region*“ des Rb-Proteins geht dabei eine direkte Interaktion mit E2F1 ein. Zusätzlich kann Rb als aktiver Repressor fungieren, in dem es im Komplex mit E2F an „*Response-Elemente*“ bindet und durch die Rekrutierung der Histondeacetylase HDAC1 eine Kompaktierung des Chromatins bewirkt. Che-1 besitzt ebenfalls eine Affinität für die *Pocket Region* von Rb, und konkurriert mit HDAC1 um die Interaktion mit Rb (Bruno *et al.*, 2002). Bei dem Übergang von der G1- in die S-phase der mitotischen Zellteilung steigt der intrazelluläre Gehalt an Che-1. Die an Rb gebundene HDAC1 wird anschließend von Che-1 verdrängt. Damit verliert Rb seinen inhibierenden Effekt auf Zielgene von E2F1, und der Übergang in die S-Phase kann stattfinden.

Demzufolge spielt AATF eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus. In Übereinstimmung mit dieser Annahme ist der Befund, daß AATF bei der TGF- $\beta$ -induzierten Differenzierung herunterreguliert wird (Lindfors *et al.*, 2000).

Die zitierten Befunde weisen auf eine Beteiligung von AATF an der Transkriptionsregulierung hin. Ob AATF als klassischer Transkriptionsfaktor fungiert, der nach Bindung an die Promotorregion der Zielgene deren Transkription induziert, oder eher als Koaktivator oder Mediator daran beteiligt ist, daß alle für die Transkription notwendigen Faktoren zu der Promotorregion rekrutiert werden, ist jedoch unklar und muß durch weitere Experimente geklärt werden.

### **1.2. Die Transkriptionskontrolle : Nuklearrezeptoren als Modell der Transkriptionsregulation**

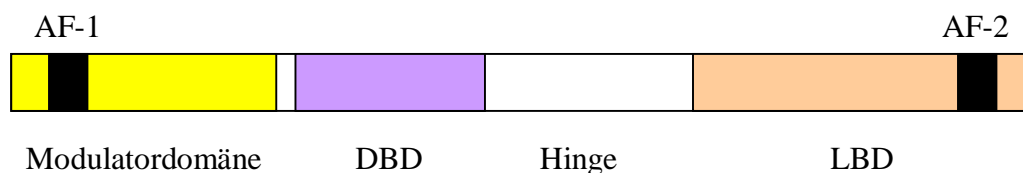
Die nukleären Hormonrezeptoren, heute kurz als Nuklearrezeptoren (NR) bezeichnet, stellen Paradigmen der Transkriptionsregulierung dar. Die NR bilden eine Familie ligandenabhängiger Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen, wie Differenzierung, Regulierung des Wachstums und der Apoptose spielen. Die Familie der NR wird üblicherweise in drei Klassen eingeteilt (Übersicht bei Giguere, 1999).

Die NR der Klasse I bilden die Steroidhormonrezeptoren. Hierzu gehören der Androgenrezeptor (AR), der Glucocorticoidrezeptor (GR), der Estrogenrezeptor (ER), der Mineralocorticoidrezeptor (MR) und der Progesteronrezeptor (PR). Diese Rezeptoren befinden sich in Abwesenheit ihres Liganden im Zytoplasma, wo sie durch eine Komplexbildung mit den Chaperonen HSP90 und HSP70 in ihrer inaktiven Form stabilisiert werden (Übersicht bei Pratt *et al.*, 1996). Da die Liganden der NR kleine, lipophile Moleküle sind, können sie die Plasmamembran problemlos durch Diffusion passieren. Nach der Bindung an den Rezeptor erfährt dieser eine Konformationsänderung, er verliert seine Affinität für die Chaperone und migriert in den Zellkern, wo er als Homodimer an Promotor- oder Enhancerelemente der Zielgene bindet und die Transkription aktiviert.

Die Klasse II der NR bilden die Nicht-Steroidhormonrezeptoren, die den Thyroidhormonrezeptor (TR), den Retinsäurerezeptor (RAR/RXR) und den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) beinhalten. Die Nicht-Steroidhormonrezeptoren binden auch in Abwesenheit des entsprechenden Hormons als Heterodimere an die Promotorregion der Zielgene. Hier unterdrücken sie jedoch die Transkription, und zwar durch die Assoziation mit Korepressoren wie z.B. die Histondeacetylasen SMRT (Agoulnik *et al.*, 2003) oder RIP140 (Mellgren *et al.*, 2003). Die Induktion mit dem entsprechenden Hormon resultiert in einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die Affinität für die Korepressoren verloren geht und die Transkription durch die Rekrutierung verschiedener Koaktivatoren aktiviert wird (siehe weiter).

Zur Klasse III der NR gehören die sogenannten Orphanrezeptoren, sowie SF1, die aufgrund ihrer Homologie zu den anderen NR identifiziert wurden. Die Liganden für diese Rezeptoren oder ihre physiologischen Aufgaben sind noch weitgehend unbekannt (Übersicht bei Giguere, 1999).

Der Vergleich der Primärstruktur verschiedener NR zeigt, daß sie eine konservierte, modulare Struktur besitzen (Übersicht bei McKenna & O'Malley, 2002)(Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der modularen Struktur von NR.**

Die typische Struktur der NR umfaßt eine Modulator-domäne, eine DNA-Bindedomäne (DBD), eine sogenannte *Hinge*-Region und eine Ligandenbindedomäne (LBD). Die beiden Transaktivierungsbereiche (AF-1 und AF-2) sind schwarz markiert.

Am N-Terminus befindet sich eine sogenannte Modulator-domäne (auch A/B-Domäne genannt). Diese Region enthält eine autonome, liganden-unabhängige Transaktivierungsdomäne (AF-1) und zeigt unter den verschiedenen NR die größte Variabilität was Länge oder Aminosäuresequenz angeht. Durch alternatives Spleißen und die Verwendung von unterschiedlichen Promotoren oder verschiedenen Startkodons, können sich

aus einem Gen mehrere Isoformen mit einer unterschiedlichen Modulator-domäne bilden (Giguere, 1999). Auf diese Weise kann eine zellspezifische Aktivität der Rezeptoren vermittelt werden (Tora *et al.*, 1988; Berry *et al.*, 1990; Vegeto *et al.*, 1993).

Die DNA-Bindedomäne (DBD) ist dagegen eine hochkonservierte Region. Sie enthält ein doppeltes Zinkfingermotiv und vermittelt die Bindung an die Erkennungssequenz in der Promotorregion der Zielgene (Schwabe & Rhodes, 1991; Übersicht bei Glass, 1994). Da die NR der Klasse I und II Dimere bilden, bestehen die Erkennungssequenzen dieser Rezeptoren aus zwei identischen Sequenzmotiven, die entweder eine palindromische Anordnung haben (Klasse I) oder als direkte Sequenzwiederholungen vorliegen (Klasse II). Für die NR der Klasse III, die als Monomer an die DNA binden, genügt ein einziges Sequenzmotiv.

Die C-terminale Ligandenbindedomäne ist eine vielseitige Region, die zuständig ist für die Bindung des Hormons, für die Dimerisierung der Rezeptoren, für die Interaktion mit Chaperonen und für den durch Ligandenbindung induzierten Transport in den Zellkern. Außerdem besitzt diese Region eine ligandenabhängige Transaktivierungsdomäne (AF-2). Die LBD ist auch zuständig für die hormonabhängige Rekrutierung vieler Koaktivatoren (siehe unten).

Zwischen der DBD und der LBD befindet sich die sogenannte *Hinge*-Region. Diese Region hat eine sehr bewegliche Struktur und ermöglicht eine Drehung der DBD über 180°. Um eine effiziente Transaktivierung zu gewährleisten, geht die LBD eine Interaktion mit der Modulator-domäne ein. Diese intramolekulare Interaktion wird durch die *Hinge*-Region ermöglicht (Loy *et al.*, 2003).

Nach der Bindung an die DNA ist die Aktivität des Rezeptors eng mit der lokalen Chromatinstruktur verknüpft. Die Struktur des Chromatins wird hauptsächlich von Wechselwirkungen zwischen DNA und Histonen bestimmt. Die DNA der nicht-konstitutiv aktiven Gene liegt meistens als sehr kompaktes Heterochromatin vor. Dabei ist die DNA so fest um die Histonoktamere gewunden, daß sie für Transkriptionsfaktoren weitgehend unzugänglich ist. Kovalente Modifikationen an den N-terminalen Seitenketten der Histone können jedoch die Interaktion mit der DNA beeinflussen und eine Auflockerung der Chromatinstruktur bewirken. Die Kopplung von negativ geladenen Gruppen an die Histone

verringert deren Affinität für die ebenfalls negativ geladene DNA und öffnet somit die kompakte Chromatinstruktur. Die wichtigsten Histonmodifikationen sind die Acetylierung, die Phosphorylierung und die Methylierung. Während die Acetylierung und Phosphorylierung immer zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur führen, ist der Effekt der Methylierung abhängig von den modifizierten AS. Die Methylierung des Histon-H3-Proteins an Lysin4 bewirkt eine Öffnung der Chromatinstruktur, wohingegen die Methylierung an Lysin9 das Chromatin verdichtet und somit die Transkription verhindert (Übersicht bei Kouzarides, 2002). Die Acetylierung und Phosphorylierung der Histonproteine sind reversible Prozesse und können von Histondeacetylasen bzw. Histonphosphorylasen rückgängig gemacht werden. Über die Demethylierung von Histon-Seitenketten ist wenig bekannt.

Zusätzlich wirken die modifizierten Nukleosomen als eine Art Kode für die Rekrutierung von ATP-abhängigen „Remodeling-Komplexen“.

Ihre Aktivität vermitteln die NR hauptsächlich durch die Rekrutierung von Koregulatoren (Übersicht bei Robyr *et al.*, 2000). Nach ihrem Einfluß auf die NR-induzierte Transkription unterscheidet man zwischen Korepressoren und Koaktivatoren. Während Korepressoren meistens eine Histondeacetylaseaktivität aufweisen oder andere Proteine mit Histondeacetylaseaktivität rekrutieren können (Nagy *et al.*, 1997), haben die Koaktivatoren zwei wichtige Aufgaben. Einerseits vermitteln Koaktivatoren wie p300/CBP oder SMCC durch die Rekrutierung des RNA-Polymerase II Holoenzym und der assoziierten TFII-Faktoren eine direkte Verbindung mit der generellen Transkriptionsmaschinerie (Nakajima *et al.*, 1997; Chiba *et al.*, 2000; Übersicht bei Dilworth & Chambon, 2001). Andererseits bewirken sie die lokale Auflockerung der Chromatinstruktur. Diese kann z.B. durch die Histonacetyltransferaseaktivität von p160 Proteinen (Chen *et al.*, 1997), GCN5 (Yang *et al.*, 1996) oder p300/CBP (Bannister & Kouzarides, 1996), durch die Methylaseaktivität von PRMT1 (Wang *et al.*, 2001a) oder durch die ATP-abhängige Helikaseaktivität des SWI/SNF Komplexes (Hirschhorn *et al.*, 1992) geöffnet werden und somit die Transkription der Zielgene ermöglichen.

Nach der Induktion mit dem entsprechenden Hormon, findet eine Konformationsänderung des Rezeptors statt. Diese veränderte Struktur setzt eine hydrophobe Spalte im Rezeptor frei, die eine direkte Bindung mit den Koaktivatoren vermittelt. In der Regel besitzen die Koaktivatoren der NR ein oder mehrere LXXLL Motive, wobei L für Leucin und X für eine

beliebige AS steht (Heery *et al.*, 1997; Heery *et al.*, 2001). Dieses Motiv bildet eine kurze amphipathische  $\alpha$ -Helix, die eine direkte Interaktion mit der hydrophoben Spalte des Rezeptors vermittelt.

Mittlerweile sind eine Vielzahl an Koaktivatoren und Korepressoren beschrieben worden (Übersicht bei Robyr *et al.*, 2000). Dies deutet auf eine komplexe Regulierung der Transaktivierung. Viele Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß ein spezifischer Koregulator nicht unbedingt mit allen NR interagiert. Dies bedeutet, daß eine erste Spezifität durch die selektive Rekrutierung der Koregulatoren stattfinden kann. Des weiteren sind nicht alle Koregulatoren in allen Geweben exprimiert. Hierdurch können identische Signale in verschiedene Geweben eine unterschiedliche Auswirkung haben. Dies steigert nicht nur die Komplexität, sondern vergrößert auch die Möglichkeiten einer sehr spezifischen Abstimmung der Transkription.

### 1.3. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit war über AATF erstens seine transaktivierende Wirkung auf die GAL4-vermittelte Transkription und zweitens die anti-apoptotische Wirkung auf die Dlk/Par-4-induzierte Apoptose bekannt. Zur physiologischen Rolle von AATF und seiner Wirkungsweise gab es jedoch keinerlei Informationen. Im Laufe dieser Arbeit wurde dann bekannt, daß AATF eine Interaktion mit dem Retinoblastomprotein Rb, sowie mit der Untereinheit 11 der RNA-Polymerase II eingeht (Fanciulli *et al.*, 2000) und essentiell für die frühe Entwicklung des Embryos ist (Thomas *et al.*, 2000). Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, weitere Interaktionspartner von AATF zu identifizieren. Hierzu wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet. Danach sollten die in der Hefe identifizierten Protein-Protein Interaktionen *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden. Anschließend sollte eine weitere Charakterisierung der identifizierten Protein-Protein-Interaktionen erfolgen. Diese Experimente sollten Hinweise auf die biologische Funktionen von AATF liefern und aufklären an welchen physiologischen Prozessen AATF beteiligt ist.

## **2. Material**

### **2.1. Chemikalien und Enzyme**

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Radiochemikalien, wie [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin und [ $^{32}\text{P}$ ]- $\gamma$ ATP, stammten von Amersham-Pharmacia Biotech (Freiburg). Enzyme wurden von Biolabs (Schwalbach), Invitrogen (Karlsruhe), Peqlab (Erlangen), Promega (Mannheim) und Roche Molecular Biochemicals bezogen.

### **2.2. Allgemeine Stammlösungen und Puffer**

<b>SSC (20x)</b>	3 M NaCl
	0,3 M Trinatriumcitrat
	60 mM EDTA
	6 % SDS

#### **2.2.1. Lösungen für die Analyse von DNA**

<b>Ladepuffer(6x)</b>	0,25 % Bromphenolblau
	0,25 % Xylencyanolblau
	15 % Ficoll 400
	30 % Glyzerin
	50 mM EDTA

<b>TAE Puffer (50x)</b> (für 1l)	242 g Tris
	57,1 ml Eisessig
	50 mM EDTA
	pH 7,9



**TE Puffer**                      10 mM Tris-HCl pH 7,5  
                                      1 mM EDTA

### 2.2.2.      Lösungen für die Arbeit mit Proteinen

**Phosphatlysispuffer (PLP)** 20 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 8  
                                      140 mM NaCl  
                                      3 mM MgCl<sub>2</sub>  
                                      0,5 % NP-40  
                                      1 mM DTT  
                                      50 µM Leupeptin

**Buffer J**                        10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
                                      140 mM NaCl  
                                      1 % DOC  
                                      1 % NP-40  
                                      0,1 % SDS  
                                      1 mM DTT  
                                      1 µg/ml Aprotinin

**Probenpuffer (2x)**            250 mM Tris-HCl, pH 6,8  
(Für die SDS-Page)        40 mM DTT  
                                      6,6 % SDS

**NEM**                            25 mg NEM  
                                      0,66 ml H<sub>2</sub>O  
                                      0,33 ml Glyzerin, gesättigt mit Bromophenolblau

## 2.3. Medien

### 2.3.1. Medien für die Kultur von Bakterien

<b>LB-Medium</b> (für 1l)	10 g Bacto-trypton 5 g Bacto Yeast Extract 5 g NaCl pH 7,5
<b>LB-Agar</b> (für 1l)	32 g LB-Agar pH 7,5
<b>dYT-Medium</b> (für 1l)	5g NaCl 10 g Bacto Yeast Extract 16 g Trypton
<b>YB-Medium</b>	dYT-Medium + 10 mM KCl + 20 mM MgSO <sub>4</sub>

Die Medien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert und gegebenenfalls vor dem Gebrauch mit den entsprechenden Antibiotika versetzt.

	Stammlösung	Gebrauchskonzentration
Ampicillin :	50 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin :	10 mg/ml	70 µg/ml

### 2.3.2. Medien für die Kultur von Hefen

<b>YPD-Medium</b> (für 1l)	10 g Hefeextrakt
(Komplettmedium)	20 g Pepton 2 % Glucose

### **Hefe Aminosäure- und Nährstoffe-Mix (AS-Mix)(10x)**

(ohne Adenin, Histidin, Tryptophan und Leucin)

L-Arginin HCl	200 mg/l
L-Aspartat	1000 mg/l
L-Glutamat	1000 mg/l
L-Isoleucin	300 mg/l
L-Lysin-HCl	300 mg/l
L-Methionin	200 mg/l
L-Phenylalanin	500 mg/l
L-Serin	4000 mg/l
L-Threonin	2000 mg/l
L-Tyrosin	300 mg/l
L-Uracil	200 mg/l
L-Valin	1500 mg/l

### **SD-Medium** (für 1l)

1,7 g Hefe Stickstoff (Basis)

(ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat)

5 g Ammoniumsulfat

18 g Agar

add 830 ml H<sub>2</sub>O, autoklavieren

+ 100 ml AS-Mix

+ 40 ml 50 % Glucose

+ 30 ml 1 M 3-amino-triazol (nur bei Platten ohne Histidin)

nach Bedarf :

+ 5 ml Adeninhemisulfat (4 g/l)

+ 5 ml L-Histidin (4 g/l)

+ 5 ml L-Leucin (20 g/l)

+ 5 ml L-Tryptophan (4 g/l)

### 2.3.3. Medien für die Kultur von Säugerzellen

**DMEM und RPMI** (Sigma), komplementiert mit 5 oder 10 % FCS (Biochrom AG, Berlin) und 1 % Peni/Strep.

**Peni/Strep (100x)**            0,6 % Penicillin  
                                     1 % Streptomycin  
                                     in PBS<sup>+</sup>, pH 8,2

**Trypsinlösung** (für 1l)        8 g NaCl  
                                     0,4 g KCl  
                                     1 g Glucose  
                                     0,2 g EDTA  
                                     6 ml Trypsin (2,5 % in PBS<sup>-</sup>)

### 2.4. Stämme und Zelllinien

#### 2.4.1. Bakterienstämme

Es handelt sich bei allen verwendeten Stämmen um K12-Derivate von *Escherichia coli*.

**DH5 $\alpha$**         F<sup>-</sup>, *hsdR*17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>-</sup>), lambda<sup>-</sup>, *supE*44, *endA*1, *thi*1, *gyrA*96.*relA*1 (Hanahan, 1983)

**M15**            K12-Mutante mit  $\Delta$ (pro-lac)*thi*,  $\Phi$ 80d, *ara-rpsL*, (*str*<sup>r</sup>), *lacZ*del (Villarejo & Zabin, 1974)

#### 2.4.2. Hefestamm

**AH109**        *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 $\Delta$* , *gal80 $\Delta$* , *LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3*, *GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-AED2*, *URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-LacZ*.

### 2.4.3. Zelllinien

REF52.2	Rattenembryofibroblasten
Rat1	Fibroblastenzelllinie aus Rattenembryonen
MCF7	Menschliche Brustkarzinomzellen
CV-1	Nierenzelllinie der Afrikanischen grünen Meerkatze
PC3	Menschliche Prostatakarzinomzellen

### 2.5. Plasmide

pCMV-Tag-2	Eukaryontischer Expressionsvektor mit dem Flag-Epitop (MDYKDDDDK) 5' des Polylinkers (Stratagene, La Jolla, USA).
pCR2.1	Plasmid für die Klonierung von PCR-Produkten (Invitrogen).
pEGFP-C1	Eukaryontischer Expressionsvektor mit dem GFP-Gen 5' des Polylinkers (Clontech, Heidelberg).
pGBT9	Hefe-Expressionsvektor mit der DNA-Bindungsdomäne von GAL4 (Clontech).
pGAD424	Hefe-Expressionsvektor mit der Transaktivierungsdomäne von GAL4 (Clontech).
pGEX6T	Vektor für die bakterielle Expression von GST-Fusionsproteinen. Modifikation des pGEX2T (Amersham-Pharmacia Biotech).
MMTV-Luc	Reporterkonstrukt mit dem Luciferasegen unter Kontrolle des MMTV-Promotors.
pSV-AR	Expressionsvektor mit der cDNA für den AR unter Kontrolle des SV40-Promotors, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. A. Brinkmann (Erasmus Universität, Rotterdam, Niederlande).
HA-TSG101	Expressionsvektor für das humane TSG101, freundlicherweise erhalten von Dr. S. Cohen (Stanford University, Stanford, USA).
pH <sub>6</sub> M-Ub	Expressionsvektor für 6xHistidin-markiertes Ubiquitin, freundlicherweise erhalten von Dr. R. Kopito (Stanford University, Stanford, USA).
pH <sub>6</sub> M-UbK48R	Expressionsvektor für eine Ubiquitin Mutante, in dem Lysin48 gegen Arginin ausgetauscht ist (Dr. R. Kopito).

## 2.6. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

### Für die Klonierung von AATF-Fragmente (396-523 und 447-523) in pGBT9

AATF396senseEcoRI	5'-GCGCTTGAATTCACCTTTGCCAGGAGAACCGG-3'
AATF447EcoRI	5'-GGCGGCGAATTCCAGGTGGCCATGGGAAGGC-3'
3'AATF-Xho	5'-GGGCCGCTCGAGTCTGCGTCCAGACGGTTGAG-3'

### Für die Klonierung der isolierten cDNA-Sequenzen aus Hefe

5'Gal4AD/ATG	5'-CCAACCCCAAAAATGGAGATCGAATTC-3'
3'pAD/MCS	5'-CTAGAGTCGACCCGGGCTCGA-3'

### Für die RT-PCR von wt TSG101

Tsg101-5'EcoRI	5'-GCACTAGAATTCATGGCGGTGTCCGAGAG-3'
Tsg101-3'SalI	5'-GAGCTTGTCGACTCAGTAGAGGTCAGTAAGGCC-3'

### Für die Klonierung von TSG101 Deletionsmutanten in pGAD424

Tsg236fEcoRI	5'-GCGGCGGAATTCAGTGACAAACTGAGATGGCGG-3'
Tsg317fEcoRI	5'-CCGCTCGAATTCGAAGTTATCATTCCCACAGCCCC-3'

### Für die Klonierung von TSG101 Deletionsmutanten in pCMV-Tag-2

Tsg142fEcoRI	5'-CCGCCGAATTCTCCCGACCTACCGTTTC-3'
Tsg326rSalI	5'-GGCGAGGTGACATACAATGGGGCTGTGGGAATG-3'

### Für die RT-PCR von Mns1

Mns1 as112	5'-CTGCCTCATCTTCTCATCC-3'
Mns5'BamHI	5'-GGCGCGGGATCCGGATGGCGAACAAAAAGAGAGCG-3'

### Für die RT-PCR von GAPDH

RatGAPDH RT-PCR for	5'-CGGTGTGAACGGATTTGGCCGTAT-3'
RatGAPDH RT-PCR rev	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'

## 2.7. Antikörper

### Primäre Antikörper

$\alpha$ -Flag	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, spezifisch gegen das Flag-Epitop des pCMV-Tag-Vektors (F3165; Sigma).
$\alpha$ -AR	Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, spezifisch gegen AR (sc-13062; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg).
$\alpha$ -TSG101	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen TSG101 (sc-7964; Santa Cruz Biotechnology).
$\alpha$ -GFP	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, der spezifisch ein Peptid des GFP-Proteins aus <i>Aequorea victoria</i> erkennt (8371-2, Clontech).

### Sekundäre Antikörper

G $\alpha$ M-Cy <sup>TM</sup> 3	Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG(H+L), konjugiert an Cy <sup>TM</sup> 3 (Dianova, Hamburg).
R $\alpha$ M-PO	Kaninchen- $\alpha$ -Maus-IgG(H+L), konjugiert an der Peroxidase aus Meerrettich (Dianova).
G $\alpha$ R-PO	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-IgG(H+L), konjugiert an der Peroxidase aus Meerrettich (Dianova).

### **3. Methoden**

#### **3.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden**

##### **3.1.1. Restriktionsverdau**

Für den Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA wurden Restriktionsenzyme des Typ II verwendet, die kurze palindromische Sequenzen erkennen. Innerhalb dieser Sequenz katalysieren sie die Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung an jedem Strang, wobei DNA-Fragmente mit glatten oder mit überhängenden Enden entstehen (Sambrook *et al.*, 1989). Die enzymatische Reaktion erfolgte in der Regel mit 2 U Enzym/ $\mu\text{g}$  DNA bei 37°C für 1h.

##### **3.1.2. Agarosegelelektrophorese**

Da DNA eine negative Ladung besitzt, kann man sie in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach auftrennen. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe zwischen 100 und 10000 bp werden in der Regel 1%-ige Agarosegele verwendet. Um die DNA-Fragmente mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar zu machen, wurde dem Gel der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 85 V in TAE-Puffer.

##### **3.1.3. Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen**

Die Aufreinigung der gewünschten DNA-Fragmente aus Agarosegelen erfolgte mit dem *Jetstar Gel Extraction Spin Kit* (Genomed, Bad Oeynhausen), wobei nach Firmenprotokoll vorgegangen wurde.

##### **3.1.4. Dephosphorylierung von Vektor-DNA**

Um eine Religation des Vektors zu verhindern, wurden vor der Ligation die 5'-Phosphatgruppen entfernt. Dazu wurde die alkalische Phosphatase verwendet. Die Reaktion



wurde mit 2 U Enzym/ $\mu\text{g}$  DNA für 30 min bei 37°C durchgeführt und anschließend durch Zugabe von 50 mM EGTA und einer 15-minütigen Inkubation bei 70°C inaktiviert.

#### **3.1.5. Ligation**

Durch die Veresterung einer endständigen 5'-Phosphorylgruppe mit einer endständigen 3'-Hydroxylgruppe können DNA-Fragmente kovalent miteinander verbunden werden. Diese Reaktion erlaubt den Einbau von DNA-Fragmenten in Plasmide und wird von der T4-DNA-Ligase katalysiert. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$ , in dem das zu inserierende DNA-Fragment und das Plasmid in einem molekularen Mengenverhältnis von 3:1 zusammen mit 0,5 U T4-DNA-Ligase für 2h bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz für die Transformation in Bakterien verwendet.

#### **3.1.6. Transformation von Bakterien**

Die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgte nach Hanahan (1983). Die Bakterien (100  $\mu\text{l}$ ) wurden auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz einem Hitzeschock für 1,5 min bei 42°C unterzogen und sofort wieder 1 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 900  $\mu\text{l}$  LB-Medium zur Bakteriensuspension gegeben und der Ansatz für 1h bei 37°C inkubiert. Diese Inkubationszeit ermöglicht es den transformierten Bakterien das Resistenzgen genügend zu exprimieren, so daß der Transformationsansatz danach auf Antibiotikumhaltige LB-Agar-Platten ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert werden konnte.

#### **3.1.7. Isolierung von Plasmiden aus Bakterien**

Die analytische Plasmidisolierung erfolgte durch alkalische Lyse der Zellen nach Birnboim & Doly (1979). Für präparative Zwecke wurde das *Jetstar Plasmid Midi Kit* (Genomed) benutzt. Dies ermöglichte die Isolierung sehr sauberer DNA in einer hohen Konzentration.

#### 3.1.8. Isolierung von Gesamt-RNA und RT-PCR

Um die cDNA-Sequenz eines Gens zu amplifizieren, wird zunächst die RNA aus den gewünschten Zellen isoliert. In einem nächsten Schritt kann dann mit Hilfe der Reversen Transkriptase und einem Oligo-dT-Primer die gesamte mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Aus dieser cDNA kann dann anschließend in einer spezifischen PCR-Reaktion die gewünschte Sequenz amplifiziert werden.

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die RT-PCR erfolgte für 45 min bei 42°C. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen :

0,5 µl Gesamt-RNA  
10 µM Oligo-dT-Primer  
1x RT-Puffer  
1 mM DTT  
2,5 mM je dNTP  
0,25 µl RNasin  
0,25 µl Reverse Transkriptase  
add 10 µl RNase-freies Wasser

Für die anschließende PCR-Reaktion wurde 1 µl des Ansatzes als Matrizen-DNA eingesetzt.

#### 3.1.9. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wurde in dieser Arbeit für die Isolierung der cDNA-Sequenzen aus der Hefe, für die Klonierung der Deletionsmutanten von AATF und TSG101, für die Amplifikation von TSG101 aus cDNA und für die Überprüfung der Expression von Mns1 in REF52.2-Zellen verwendet.

Für die PCR-Reaktion wurden synthetische Oligonukleotide konstruiert, die über einen Bereich von 18 bis 22 Basen zu den 5'- bzw. 3'-Enden der zu amplifizierenden DNA homolog sind. Nach Möglichkeit wurde ein Bereich mit einem GC-Gehalt von ungefähr 50%

gewählt. Die Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide lässt sich nach folgender vereinfachten Formel bestimmen :

$$T_H = [(A/T \times 2) + (G/C \times 4)] - 5$$

und sollte nicht unter 50°C liegen. Um die Klonierung der PCR-Produkte zu erleichtern, enthielten die meisten Oligonukleotide an ihrem 5'-Ende zusätzlich noch eine Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym.

Falls die amplifizierten PCR-Produkte zur Klonierung gedacht waren, wurde die Pwo-Polymerase eingesetzt. Diese Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die eine Korrekturlesefunktion darstellt und die Fehlerhäufigkeit um einen Faktor fünf verringert. Für alle anderen Reaktionen wurde die Taq-Polymerase verwendet.

Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen :

1 ng Matrizen-DNA  
20 pmol je Primer  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
200 µM je dNTP  
1x PCR Puffer  
0,5 U Polymerase  
add 100 µl H<sub>2</sub>O.

Die Inkubation des PCR-Ansatzes erfolgte nach folgendem Schema :

94°C	3'	Denaturierung
94°C	1'	Denaturierung
x °C	45''	Anlagerung der Oligonukleotide
72°C	1'/kb	Elongation
72°C	7'	Abschlußelongation

wobei x die errechnete Hybridisierungstemperatur darstellt.

Für weitere Klonierungszwecke wurde das PCR-Produkt mit dem *PCR Product Purification Kit* (Genomed) aufgereinigt.

## 3.2. Das Zwei-Hybrid-System

Die hier verwendete Version des Zwei-Hybrid-Systems beruht auf dem Transkriptionsfaktor GAL4. Dieser Transkriptionsfaktor enthält eine DNA-Bindungsdomäne (DBD) und eine Transaktivierungsdomäne (TAD). Werden jetzt beide Domänen von einander getrennt, dann behalten beide ihre charakteristischen Eigenschaften, aber die GAL4-vermittelte Transkription kann nicht mehr stattfinden. In dem Zwei-Hybrid-System werden jetzt beide Domänen als Fusionsprotein mit einem anderen Protein exprimiert. Wenn beide Fusionspartner direkt miteinander interagieren, wird die GAL4-TAD zur DBD rekrutiert und die GAL4-aktivierte Transkription wird induziert.

Der hier verwendete Hefestamm enthält in seinem Genom drei Reportergene (Ade2, His3 und LacZ) unter Kontrolle von unterschiedlichen GAL4-induzierbaren Promotoren (Gal1, Gal2 und Mel1). Des weiteren ist er auxotroph für Adenin, Tryptophan, Histidin und Leucin, was eine effiziente Selektion ermöglicht.

Um potentielle Interaktionspartner eines Proteins zu isolieren, kloniert man das entsprechende Gen hinter der kodierenden Sequenz der GAL4-DBD. Eine cDNA-Bank wird hinter der kodierenden Sequenz für die GAL4-TAD eingebracht. Nach der Transformation in Hefezellen und der entsprechenden Selektion kann man jetzt die Zellen isolieren, die eine GAL4-vermittelte Transkription aufweisen und damit eine cDNA-Sequenz enthalten, die für einen potentiellen Interaktionspartner kodiert.

### 3.2.1. Transformation von Hefen

Vor der eigentlichen Transformation werden die Hefezellen kompetent gemacht. Dazu wird eine ÜN-Kultur in 50 ml YPD auf eine  $OD_{600} = 0,2$  verdünnt und bei 30°C inkubiert bis  $OD_{600} = 0,6$ . Die Zellen werden dann 5 min bei 2000 rpm sedimentiert, 2x mit  $H_2O$  und 1x mit LiAc/TE gewaschen und in 1 ml LiAc/TE aufgenommen.

Der Transformationsansatz setzt sich wie folgt zusammen :

- 50 µl Hefe-Suspension
- je 1 µg Plasmid-DNA
- 50 µg Heringssperma-DNA (durch 10 minütiges Kochen denaturiert)
- 300 µl PEG/LiAc/TE

Der Transformationsansatz wurde unter Schütteln 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42°C. Danach wurden die Zellen für 30 sec bei 14000 rpm sedimentiert, in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan ausplattiert. Da die verwendeten Plasmide Gene enthalten, die für die Synthese von Leucin und Tryptophan benötigt werden, konnten nur die Hefezellen, die beide Plasmide aufgenommen haben, in Abwesenheit dieser Aminosäuren wachsen.

Um eine Interaktion der exprimierten Proteine zu untersuchen, wurden die Hefekolonien nach 3 bis 5 Tagen auf SD-Medium ohne Adenin oder ohne Histidin ausgestrichen und einer Wachstumsanalyse unterzogen.

LiAc/TE	100 mM LiAc
	10 mM Tris
	1 mM EDTA, pH 7,5

PEG/LiAc/TE	40 % PEG 3350
	100 mM LiAc
	10 mM Tris
	1 mM EDTA, pH 7,5

#### **3.2.2. Transformation von Hefen mit einer cDNA-Bank**

Für die Transformation einer cDNA-Bank wurde eine aufwendigere Methode gewählt, die sich durch eine sehr hohe Transformationseffizienz auszeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine cDNA-Bank aus SV52-Zellen (SV40 transformierte REF52) verwendet, die von Frau Dr. A. Gockel im Rahmen ihrer Doktorarbeit konstruiert wurde und im Labor zur Verfügung stand.

Zunächst wurden die Hefezellen mit einem Plasmid, das die kodierende Sequenz eines Fusionsproteins der GAL4-DBD mit einem C-terminalen Fragment von AATF (AS 396-523) enthält, vortransformiert. Eine ÜN-Kultur der vortransformierten Hefezellen wurde in 500 ml

YPD so verdünnt, daß sie eine  $OD_{600} = 0,3$  aufwiesen, und weiter bei 30°C inkubiert, bis eine  $OD_{600} = 0,7$  erreicht war. Die Hefesuspension wurde 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert, mit 100 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, in 50 ml LiSORB resuspendiert und 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen auf Eis in 625 µl LiSORB resuspendiert. Die cDNA-Bank (60 µg) und 4 mg Heringssperma-DNA (denaturiert durch 10-minütiges Kochen) wurden in 800 µl LiSORB gemischt, zu den Hefezellen gegeben und mit 11,25 ml PEG/LiAc/TE versetzt. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 30°C inkubiert und gelegentlich geschwenkt. Danach wurde 1,5 ml DMSO zu dem Ansatz gegeben und es erfolgte ein Hitzeschock für 6 min bei 42°C. Zur schnellen Abkühlung wurden 200 ml kaltes SD-Medium zu den Zellen gegeben, 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert und das Pellet in 100 ml SD-Medium resuspendiert. Für die Ermittlung der Transformationseffizienz wurden 100 µl entnommen und auf eine SD-Platte ohne Tryptophan und Leucin ausplattiert. Die restlichen Zellen wurden für weitere 3h bei 30°C inkubiert, 10 min bei 2500 rpm sedimentiert, in 6 ml YPD resuspendiert und auf 30 SD-Platten ohne Histidin, Leucin und Tryptophan ausplattiert. Die Kolonien, die nach 14 Tagen einen Durchmesser von mindestens 2 mm hatten, wurden für eine weitere Selektion auf SD-Platten ohne Adenin, Leucin und Tryptophan ausgestrichen.

LiSORB	100 mM LiAc
	10 mM Tris, pH 8,4
	1 mM EDTA
	1 M Sorbitol

#### **3.2.3. Aufschluß der Hefe-Zellwand und Isolierung der cDNA**

Die Isolierung der cDNA aus den positiv getesteten Hefen erfolgte mit dem *Whole Cell Yeast PCR Kit* (Qbiogene, Grünberg). Nach dem enzymatischen Abbau der Zellwand wurden die entsprechenden cDNA-Sequenzen mittels PCR amplifiziert, in pCR2.1 kloniert und einer Sequenzanalyse unterzogen (Agowa, Berlin).

## 3.3. Proteinchemische Techniken

### 3.3.1. Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien

Zur Expression von GST-Fusionsproteinen wurde der *E. coli* M15 Stamm mit dem jeweiligen Expressionsvektor transformiert. Eine Einzelkolonie wurde in LB/Ampicillin angeimpft und üN bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde diese Vorkultur 1/50 in LB/Ampicillin verdünnt und bis zu einer  $OD_{600} = 0,6$  inkubiert. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG. Nach weiteren 3h wurden die Bakterien geerntet, mit PBS<sup>+</sup> gewaschen und bei -70°C gelagert.

Pro Ansatz wurde das Pellet aus 1 ml Bakterienkultur verwendet. Zur Aufreinigung wurde das gewaschene Pellet in 100 µl modifiziertem PBS<sup>+</sup> gelöst und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 1% Triton X-100, 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 2 U DNase zu dem Ansatz gegeben und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm wurden 25 µl Glutathion-gekoppelte Sepharose zu dem Überstand gegeben und 1h bei 4°C rotiert. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Sepharose 3x mit PLP gewaschen. Der Ansatz stand nun für *in vitro*-Bindungsexperimente zur Verfügung.

Modifiziertes PBS <sup>+</sup>	1 mM DTT
	1 mM EDTA
	50 µM Leupeptin
	1 µg/ml Aprotinin
	1 mM PMSF
	0,5 mg/ml Lysozym
	in PBS <sup>+</sup>

### 3.3.2. *In vitro*-Transkription und Translation

Für die *in vitro*-Bestätigung der Protein-Protein-Interaktionen wurde AATF radioaktiv markiert. Dies erfolgte mit dem *TNT-T3/T7 Coupled Reticulocyte Lysate Kit* (Promega). Die

cDNA für AATF wurde in den pCMV-Tag-2b Vektor kloniert. Dieses Plasmid enthält 5' des Polylinkers einen T3-Promotor, der für die Transkription benutzt werden kann.

Die synthetisierten Proteine wurden durch Zugabe von [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert.

Anschließend wurden 20 µg RNase A und 1 µg Leupeptin zugesetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Die RNase reduziert den radioaktiven Hintergrund, der durch [<sup>35</sup>S]-Methionin-beladene t-RNA entsteht. Das Leupeptin verhindert den Abbau der synthetisierten Proteine.

#### **3.3.3. *In vitro*-Nachweis der Protein-Protein-Interaktionen**

Dieses Experiment wurde durchgeführt um die Interaktion von AATF mit den im Zwei-Hybrid-System identifizierten Proteinen zu bestätigen. Dazu wurden die identifizierten Proteine als GST-Fusionsprotein an der Glutathion-Matrix gebunden (siehe 3.3.1.). AATF wurde *in vitro* translatiert und dabei radioaktiv markiert (siehe 3.3.2.). Nun wurden zu jeder Bindungsreaktion 4 µl radioaktiv markiertes AATF in 200 µl PLP gegeben. Der Ansatz wurde 1h bei 4°C rotiert und anschließend 2x mit PLP und 2x mit Buffer J gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch die Zugabe von 30 µl 2x Probenpuffer und Inkubation für 5 min bei 60°C. Abschließend wurden die eluierten Proteine 3 min gekocht, mit 10 µl NEM versetzt und durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert.

#### **3.3.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE dient dem Auftrennen von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Durch die Anlagerung von SDS werden die Proteine denaturiert, und wird eine Nettoladung erzeugt, die die Eigenladung der Proteine überlagert und proportional ist zu deren Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die Proteine zuerst im Sammelgel bei pH 6,8 konzentriert und anschließend im Trenngel bei pH 8,8 aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentration im Trenngel variierte von 7,5 bis 12,5 %, je nach Größe der aufzutrennende Proteine.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt und 3 min gekocht. Danach wurde 1/3 Volumen NEM zugegeben.

Die Elektrophorese im Sammelgel erfolgte bei 17 mA, im Trenngel bei 34 mA. Je nach Versuchsansatz wurde das Gel unterschiedlich weiterbehandelt. Der spezifische Nachweis



von Proteinen erfolgte im Western Blot, [<sup>35</sup>S]-markierte Proteine wurden durch Fluorographie nachgewiesen.

Sammelgel	3 ml H <sub>2</sub> O
	1,25 ml Sammelgelpuffer
	0,75 ml Acrylamidlösung (30%)
	15 µl APS (10%)
	5 µl TEMED

Sammelgelpuffer	0,5 M Tris
	0,4 % SDS
	pH 6,8

Trenngel (10%)	6,7 ml H <sub>2</sub> O
	4 ml Trenngelpuffer
	5,3 Acrylamidlösung (30%)
	80 µl APS (10%)
	4 µl TEMED

Trenngelpuffer	1,5 M Tris
	0,4 % SDS
	pH 8,8

Elektrophoresepuffer	0,19 M Glycin
	25 mM Tris
	0,5 mM SDS

#### 3.3.5. Fluorographie

Durch Fluorographie wurden radioaktiv-markierte Proteine nachgewiesen. Hierzu wurde das PAA-Gel zunächst 30 min in 10%-iger Essigsäure fixiert und anschließend für weitere 30 min mit *Amplify* (Amersham-Pharmacia Biotech) behandelt. Hierdurch lagerte sich ein Fluoreszenzfarbstoff in das Gel ein, der die energiearme β-Strahlung des [<sup>35</sup>S]-Isotops

verstärkt. Abschließend wurde das Gel gewässert und getrocknet. Die Exposition erfolgte für 16 bis 72h bei  $-70^{\circ}\text{C}$  (X-OMAT AR, Kodak, Stuttgart).

#### **3.3.6. Western Blot**

Die Übertragung der Proteine aus dem PAA-Gel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte in der Regel bei 80 V für 1h. Für den immunologischen Nachweis der gebundenen Proteine wurde die Membran zur Absättigung freier Bindungsstellen zuerst 2h in TBS-Tween mit 5% Milchpulver inkubiert und anschließend 3x mit TBS-Tween gewaschen. Der primäre Antikörper wurde 1:2000 ( $\alpha$ -GFP) oder 1:1000 ( $\alpha$ -AR) in TBS-Tween verdünnt und 1h auf der Membran belassen. Nach dieser Inkubation wurde die Membran erneut 3x gewaschen. Danach wurde der sekundäre Antikörper (R $\alpha$ M oder G $\alpha$ R, beide Peroxidase gekoppelt) 1:10000 in TBS-Tween verdünnt und 30 min mit der Membran inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das Substrat der Peroxidase auf die Membran verteilt und weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis der Chemilumineszenzreaktion erfolgte auf einem Röntgenfilm (X-OMAT AR, Kodak) für 15 sec bis 45 min.

TBS-Tween	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM NaCl
	0,05 % Tween 20

#### **3.4. Zellkultur und immunhistochemische Techniken**

##### **3.4.1. Kultur von Säugerzellen**

REF52.2, CV-1 und Rat1-Zellen wurden in DMEM mit 10% (REF52.2 und CV-1) oder 5% FCS (Rat1) kultiviert. MCF7 und PC3-Zellen wurden in RPMI-1640 mit 10% FCS kultiviert. Zur Passage wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in frischem Medium in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:12 ausplattiert.

#### **3.4.2. Transfektion von Säugerzellen**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen hatten alle das Ziel, die transiente Expression bestimmter Proteine zu analysieren. Dazu wurden REF52, PC3, MCF7 und CV-1-Zellen durch Lipofektion und Rat1-Zellen mittels Calcium-Phosphat transfiziert.

##### **3.4.2.1. Lipofektion**

Bei der Lipofektion wird eine kationische Lipidlösung mit der DNA gemischt. Es bilden sich DNA-haltige Liposomen, die nach Verschmelzung mit der Zellmembran in die Zelle eintreten können.

In dieser Arbeit wurde das JetPEI (Qbiogene, Grünberg) als Transfektionsreagenz eingesetzt. Folgende Angaben beziehen sich auf die Transfektion einer 10 cm Platte.

In einem Reaktionsgefäß wurde die DNA (10 µg) in 250 µl 150 mM NaCl aufgenommen und gemischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 10-15 µl Transfektionsreagenz in 250 µl 150 mM NaCl gemischt. Beide Ansätze wurden zusammengefügt und gut gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz vorsichtig zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 16h wurden die Zellen mit PBS<sup>+</sup> gewaschen und je nach Anwendung mit neuem Medium versehen.

##### **3.4.2.2. Transfektion mittels Calcium-Phosphat**

Bei der Calciumphosphat-vermittelten Transfektion werden CaCl<sub>2</sub> und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in Anwesenheit der DNA gemischt. Es bilden sich Calciumphosphatkristalle, welche die DNA binden können und durch Endozytose von der Zelle aufgenommen werden.

Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf die Transfektion einer 6 cm Platte.

Das Medium wurde 1-2h vor Transfektion erneuert. Pro Platte wurde 2,5 ml Medium vorgelegt. Die zu transfizierende DNA (2 µg) wurde mit 112,5 µl H<sub>2</sub>O und 12,5 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> gemischt. In ein Rundbodenröhrchen wurden 125 µl 2xHBS-Puffer vorgegeben. Mit Hilfe einer Pateurpipette wurde ein kontinuierlicher Luftstrom durch den HBS-Puffer geblasen. Die DNA-Lösung wurde nun langsam zum HBS-Puffer getropft. Danach wurde der Transfektionsansatz 20 min bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig zu den Zellen

gegeben. Nach 16h wurden die Zellen 1x mit PBS<sup>+</sup> gewaschen, je nach Anwendung mit neuem Medium versehen und weiter im Brutschrank inkubiert.

2xHBS-Puffer	280 mM NaCl
	10 mM KCl
	1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	12 mM Glucose
	50 mM Hepes
	pH 7 (für Rat1)

#### **3.4.3. Immunfluoreszenzfärbung**

Mit dieser Technik wurde die intrazelluläre Lokalisation verschiedener Proteine in transient transfizierten Zellen untersucht. GFP-Fusionsproteine können durch ihre eigene Fluoreszenz nach Bestrahlung mit UV-Licht direkt nachgewiesen werden. Die Detektion anderer Proteine erfolgte indirekt und wurde von Antikörpern vermittelt.

Bei der Immunfärbung wurde wie folgt vorgegangen : ca. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen 2x mit PBS<sup>+</sup> gewaschen und 15 min in 3% Paraformaldehyd (in PBS<sup>+</sup>) fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen permeabilisiert und gesättigt in einer PBS<sup>+</sup>-Lösung, die 0,1 % Triton X-100, 1% Ziegen Serum und 5% Milchpulver enthielt. Der primäre Antikörper wurde 1:2500 (α-Flag) oder 1:500 (α-TSG101) in PBS<sup>+</sup> mit 0,1% Triton X-100 und 10% Ziegen Serum verdünnt und 1h auf den Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen 3x mit PBS<sup>+</sup> gewaschen, der sekundäre Antikörper (GoM-Cy3) 1:500 in PBS<sup>+</sup> mit 10% Triton X-100 und 1% Ziegen Serum verdünnt und 30 min auf den Zellen belassen. Nach erneutem Waschen mit PBS<sup>+</sup> wurden die Zellen für 15 min mit 1 µg/ml 4',6'-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI) inkubiert. Dieser fluoreszierende Farbstoff hat eine hohe Affinität für DNA und färbt somit die Zellkerne. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS<sup>+</sup> und 1x mit H<sub>2</sub>O gewaschen und umgekehrt auf einem Objektträger in einen Tropfen Einbettmedium gelegt (Permafluor, Beckman Coulter GmbH, Krefeld). Zum Aushärten des Einbettmediums wurden die Objektträger üN bei 4°C gelagert.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte am Axiophot (Zeiss, Oberkochen) mit folgenden Filtern :

GFP	Filter FT 510, BP 450-490, LP 515-565
Cy <sup>3</sup> , Texas-Red	Filter FT 580, BP 546, LP 590
DAPI	Filter FT 396, BP 365, LP 397

#### 3.4.4. Anfärbung der endosomalen und lysosomalen Strukturen

Für die Anfärbung der Endosomen wurden 4h vor der Fixierung 10 µg/ml Texas-Red gekoppeltes Ovalbumin (Molecular Probes, Leiden, Niederland) zu den Zellen gegeben. Ovalbumin wird von den Zellen durch Endozytose aufgenommen (Refolo *et al.*, 1995; Swanson & Isberg, 1996) und die Kopplung an dem fluoreszierenden Farbstoff Texas-Red ermöglicht die Detektion im Fluoreszenzmikroskop.

Für die Anfärbung der lysosomale Strukturen wurden die Zellen 4h vor der Fixierung mit 1 µM LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes) behandelt. Dieser Farbstoff ist ein basisches Amin, das selektiv in den Lysosomen akkumuliert (Griffiths *et al.*, 1988).

#### 3.5. Northern Blot

In dieser Arbeit wurde ein kommerziell erworbener mRNA-Blot verwendet, der RNA-Proben aus folgenden Geweben der Ratte enthielt: Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Hoden (7764-1, Clontech).

Für die radioaktive Markierung der Sonde wurde das *MegaPrime Kit* (Amersham-Pharmacia Biotech) verwendet. Der Markierungsansatz setzte sich aus 50 ng der zu markierenden DNA, einem Primergemisch, den unmarkierten Nukleotiden, Klenow Polymerase und 4 µCi [<sup>32</sup>P]-α-CTP (3000 Ci/mmol) zusammen und wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM EDTA gestoppt. Anschließend wurden die nicht eingebauten Nukleotide mittels einer Sephadex-G50-Chromatographie entfernt.

Zur Absättigung wurde der Blot zunächst 4h bei 42°C einer Prähybridisierung unterzogen. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit der [<sup>32</sup>P]-α-CTP-markierten Sonde üN bei ebenfalls 42°C. Gewaschen wurde zuerst mit niedriger Stringenz (2x SSC; 0,1 % SDS bei 50°C). Langsam wurde die Stringenz erhöht (bis 0,5x SSC; 0,1 % SDS bei 60°C), bis mit dem Handmonitor noch 50-100 cpm auf dem Blot meßbar waren. Abschließend erfolgte die Autoradiographie üN bei -70°C (X-OMAT, Kodak).

#### **3.6. Transiente Expressionsexperimente zur Untersuchung der Luciferaseaktivität**

Um den Einfluß von AATF und TSG101 auf die AR-vermittelte Transaktivierung zu untersuchen, wurden transiente Expressionsanalysen mit dem Luciferase-Reportergen unter Kontrolle des MMTV-Promotors durchgeführt.

Um die Transfektionseffizienz möglichst konstant zu halten, wurden in einem Experiment immer die gleichen DNA-Gesamtmenge eingesetzt, wobei Ansätze mit niedrigerem DNA-Gehalt mit dem pCMV-Tag-2 Plasmid ausgeglichen wurden.

Der Transfektionsansatz wurde 16h auf den Zellen belassen. Danach wurden die Zellen mit PBS<sup>+</sup> gewaschen und mit 10 nM Dihydrotestosteron (DHT) für weitere 24h induziert. Im Anschluß wurden die Zellen 2x mit PBS<sup>+</sup> gewaschen und mit 200 µl Lysispuffer pro Platte 15 min auf der Wippe bei RT inkubiert. Die Zellextrakte wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Messung der Luciferaseaktivität in 20 µl des Überstandes erfolgte nach Zugabe von 100 µl Luciferasereagenz für 10 sec in einem Lumat LB9501 Luminometer (Berthold, Bad Wildbad).

Lysispuffer	77 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 23 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 % Triton X-100 1 mM DTT pH 7,8
Luciferasereagenz	20 mM Tricin 2,67 mM MgSO <sub>4</sub> 0,1 mM EDTA 33,3 mM DTT 530 µM ATP 1,07 mM (MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> 270 µM Coenzym A 470 µM D-Luciferin

#### 3.7. *In vivo* Nachweis von ubiquitinierten Proteinen

Ubiquitinierte Proteine sind nach dem Aufschluß der Zelle sehr instabil und werden sehr schnell von den Proteasomen abgebaut. Deswegen wurde ein System benutzt, mit dem ubiquitinierte Proteine unter denaturierenden Bedingungen isoliert und analysiert werden können (Treier *et al.*, 1994). Dazu wird Ubiquitin, das mit einem 6xHistidin-Epitop versehen ist, ektopisch exprimiert. Die ubiquitinierten Proteine können dann mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie auch unter denaturierenden Bedingungen isoliert werden.

Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde jedem Transfektionsansatz ein Expressionvektor für GFP zugefügt.

Pro Ansatz wurde eine 10 cm Platte MCF7-Zellen mit insgesamt 10 µg DNA transfiziert. Der Transfektionsansatz wurde 16h auf den Zellen belassen. Die Zellen wurden dann mit PBS<sup>+</sup> gewaschen, mit frischem Medium versehen und für weitere 8h mit 10 nM DHT induziert. Um den intrazellulären Abbau Ubiquitiniertter Proteine zu verhindern, wurde anschließend der Proteasomeninhibitor MG132 (corbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal; Calbiochem, Darmstadt) in einer Konzentration von 2 µM zu den Zellen gegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 16h wurden die Zellen mit PBS<sup>+</sup> gewaschen und in 500 µl PBS<sup>+</sup> von der Platte abgeschabt. Aus der Zellsuspension wurden 10% der Zellen abgenommen, sedimentiert und in PLP für 10 min auf Eis aufgeschloßen. Das Lysat wurde für die Überprüfung der Transfektionseffizienz mit einem α-GFP Antikörper im Western Blot analysiert.

Die restlichen Zellen wurden in 500 µl denaturierendem Lysispuffer aufgeschlossen, 1 min auf Eis sonifiziert und 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Parallel wurden 30 µl der Ni-NTA-Agarose mit 200 µl Äquilibrierungspuffer gewaschen. Das Zelllysate wurde zu der Agarose gegeben, kurz gevortext und 1h bei RT im Rotor inkubiert. Anschließend wurde die Agarose 3x gewaschen und die gebundenen Proteine mit 2x Probenpuffer für 5 min bei 100°C eluiert. Nach Zugabe von NEM wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot weiter analysiert.

Denaturierender Lysispuffer 6M Guanidiniumhydrochlorid

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10 mM Tris-HCl

20 mM Imidazol

pH 8,0

### 3. Methoden

---

Äquilibrationpuffer	8M Harnstoff
	100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
	10 mM Tris-HCl
	20 mM Imidazol
	pH 8,0
Waschpuffer	8M Harnstoff
	100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
	10 mM Tris-HCl
	20 mM Imidazol
	pH 6,2



## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Identifizierung neuer Interaktionspartner von AATF mit dem Zwei-Hybrid-System**

AATF wurde in unserer Arbeitsgruppe als Interaktionspartner der Dlk/ZIP Kinase isoliert (Page *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, daß AATF in Hefe eine transaktivierende Wirkung auf die GAL4-vermittelte Transkription hat. Ferner konnte durch die Expression von AATF die Dlk/Par4-induzierte Apoptose unterdrückt werden. Ein weiterer Befund war, daß AATF (Che-1) durch eine Interaktion mit Rb den Transkriptionsfaktor E2F aktiviert und so in die Regulierung des Zellzyklus eingreifen kann (Fanciulli *et al.*, 2000).

Zielsetzung dieser Arbeit war es, mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems neue Interaktionspartner von AATF zu identifizieren.

Da AATF in Hefe eine inhärente Transaktivierungsaktivität besitzt, würde ein Fusionsprotein von AATF mit der GAL4-DNA-Bindedomäne (DBD) die GAL4-induzierte Transkription auch in Abwesenheit der GAL4-Transaktivierungsdomäne (TAD) aktivieren. Um dies zu umgehen, wurde ein C-terminales Fragment von AATF (AS 396-523), das keine transaktivierende Wirkung mehr besitzt, im Zwei-Hybrid-System als Köder eingesetzt. Dieses Fragment enthält zwei von drei hochkonservierten Regionen sowie eines von drei LXXLL Bindemotiven für NR (Abbildung 3A). Somit konnte man erwarten, Interaktionspartner für diesen Bereich zu finden.

Zunächst wurde der Hefestamm mit dem Expressionsvektor für die DBD und dem AATF(396-523)-Fragment vortransformiert. Nach der anschließenden Transformation der cDNA-Bank wurden 543000 unabhängige Hefeklonen auf Histidin-Autotrophie analysiert. In einem weiteren Selektionsschritt wurden die entsprechenden Hefekolonien auf Medium ohne Adenin ausgestrichen. Aus den Hefeklonen, die beide Selektionsschritte überstanden hatten, wurde die cDNA mittels PCR amplifiziert, in den Vektor pCR2.1 kloniert und sequenziert. Dabei konnten vier Klone, die für potentielle Interaktionspartner kodieren, isoliert werden. Die so erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem HUSAR-Analyseprogramm der Universität Heidelberg charakterisiert, und mit Sequenzen der cDNA-Datenbank EMBL verglichen. Für alle isolierten cDNA-Sequenzen wurden homologe Sequenzen in der Datenbank gefunden. Die wichtigsten Informationen zu diesen Klonen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

#### 4. Ergebnisse

Klon	Gesamtlänge der cDNA (bp)	Homolog zu [%]	AS in cDNA des Klons
1	1700	<i>Meiosis-Specific Nuclear Structural Protein 1</i> (Mns1) <sup>1</sup> - 492 AS [93,3 %]	2-492
2	1150	<i>Polyamine Modulated Factor-1</i> (Pmf-1) <sup>2</sup> - 203 AS [87,1 %]	2-203
3	950	cDNA aus ES-Zellen AK010745 (AIP1) - 153 AS [96,6 %]	1-153
4	900	<i>Tumor Susceptibility Gene 101</i> (TSG101) <sup>3</sup> - 391 AS [99,1 %]	191-391

**Tabelle 1: Isolierte cDNA-Klone aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-System**

Die cDNA-Klone wurden alle ansequenziert über einem Bereich von mindestens 360 Nukleotiden. Alle homologen cDNA-Sequenzen aus der Datenbank stammten aus der Maus. Angegeben sind die Länge des homologen Proteins in AS, sowie der Grad der Homologie zur Rattensequenz in %. Der angegebene Homologiegrad bezieht sich jeweils auf den sequenzierten Bereich. Die cDNA-Sequenz von Klon 3 findet man in der EMBL-Datenbank unter der Zugangsnummer AK010745. Referenzen zu den homologen Proteinen findet man unter <sup>1</sup>Furukawa *et al.* (1994), <sup>2</sup>Wang *et al.* (1999) und <sup>3</sup>Li *et al.* (1996).

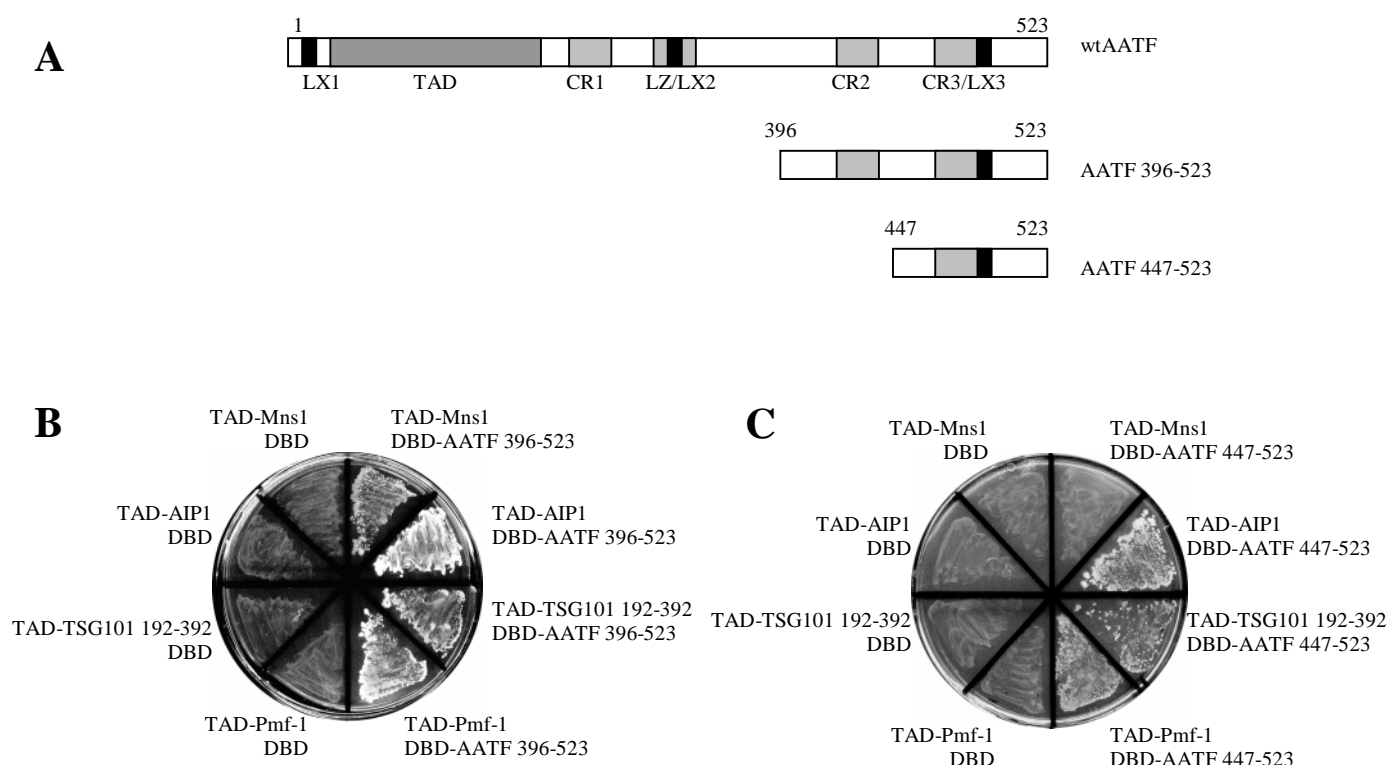
Klone 1, 2 und 4 kodierten für die bereits bekannten Gene Mns1, Pmf-1 und TSG101. Für drei Klone (1, 2 und 3) wurden nahezu vollständige cDNA-Sequenzen isoliert. Dagegen enthielt Klon 4 nur das 3'-Ende der cDNA-Sequenz, das für den C-terminalen Bereich des Proteins (AS 191-391) kodierte. Alle isolierten cDNA-Sequenzen befanden sich im gleichen Leseraster wie die GAL4-TAD.

Für Klon 3 wurde eine hohe Homologie mit einer cDNA aus der Maus festgestellt, die für ein hypothetisches, noch nicht charakterisiertes Protein kodiert. Dieser Klon wurde im folgenden als AIP1 für „AATF Interagierendes Protein 1“ bezeichnet.

Um die identifizierten Protein-Protein-Interaktionen nochmals in der Hefe zu bestätigen, wurden die cDNA-Sequenzen einer Retransformationskontrolle unterzogen. Dazu wurden die TAD-cDNA-Konstrukte gemeinsam mit dem verwendeten DBD-AATF(396-523)-Plasmid in die Hefezellen transformiert. Um auszuschließen, daß die Konstrukte eine autoaktivierende

## 4. Ergebnisse

Wirkung auf das Zwei-Hybrid-System haben, und um zu verifizieren, daß die Aktivierung der GAL4-vermittelten Transkription auf eine Interaktion mit dem AATF-Fragment, und nicht mit der GAL4-DBD zurückzuführen ist, wurden die TAD-cDNA-Konstrukte auch gemeinsam mit der GAL4-DBD (ohne AATF) exprimiert. Eine anschließende Selektion auf Wachstum in Abwesenheit von Histidin oder Adenin bestätigte für alle identifizierten Klone die Spezifität der Protein-Protein-Interaktion mit AATF in Hefen (Abbildung 3B).



**Abbildung 3: Interaktion von AATF mit Mns1, AIP1, TSG101 und Pmf-1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System.**

A) Schema der im Zwei-Hybrid-System eingesetzten AATF-Konstrukte. Der obere Balken repräsentiert das gesamte AATF mit den in Abbildung 1 der Einleitung erläuterten Strukturbereichen. Der mittlere Balken stellt das als Köder eingesetzte C-terminale Fragment dar, der untere Balken das in C) verwendete Fragment zur Kartierung der Interaktionsdomänen; B) Wachstumstest der transformierten Hefezellen auf SD-Medium ohne Adenin. Gleiche Befunde wurden beobachtet nach Selektion auf SD-Medium ohne Histidin. C) Identisch mit B), jedoch mit einem AATF(447-523)-Fragment statt AATF(396-523).

### 4.2. Kartierung der Interaktionsdomänen in AATF

Das im Zwei-Hybrid-System eingesetzte AATF-Konstrukt kodierte für den C-terminalen Bereich des Proteins (AS 396-523), und grenzte die Interaktionsdomäne bereits auf diesen Bereich ein. Um die Interaktionsdomänen in AATF noch weiter einzugrenzen, wurde ein AATF-Fragment von AS 447 bis 523 im Zwei-Hybrid-System eingesetzt (Abbildung 3A). Die Wachstumsanalysen der transformierten Hefezellen zeigten, daß für die Interaktion mit AIP1, TSG101 und Pmf-1 die Region zwischen AS 447 und 523 ausreichend ist. Für die Interaktion mit Mns1 ist jedoch der Bereich zwischen AS 396 und 446 unentbehrlich (Abbildung 3C). Diese Daten zeigten, daß die isolierten Proteine, mit Ausnahme von Mns1, mit der gleichen C-terminalen Region von AATF interagieren.

### 4.3. *In vitro* Bestätigung der Interaktionen von AATF mit den potentiellen Bindungspartnern

Zur Bestätigung der Protein-Protein-Interaktionen von AATF mit den im Zwei-Hybrid-System identifizierten Klonen wurde ein *in vitro*-Bindungsexperiment durchgeführt. Dazu wurden die isolierten Klone als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* exprimiert und mittels Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Anschließend wurde die Bindung von *in vitro*-translatiertem, [<sup>35</sup>S]-Methionin-markiertem AATF untersucht. Als Kontrolle wurde die Bindung von AATF an GST analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

Die Bindung von AATF an die GST-Fusionsproteine von Mns1 und Pmf-1 konnte nicht eindeutig von der Bindung an GST unterschieden werden. Für Pmf-1 wurde überhaupt keine Anreicherung an AATF beobachtet: das für Mns1 ermittelte Signal kam nur sehr schwach über den Hintergrund der Bindung an GST hinaus. AATF zeigte jedoch eine deutliche Bindung an AIP1 und TSG101. Eine klare Anreicherung an radioaktiv markiertem AATF wurde nach der Inkubation mit den GST-Fusionsproteinen dieser beiden Interaktionspartner festgestellt.



**Abbildung 4:** *In vitro*-Bindungsexperiment zur Bestätigung der identifizierten Protein-Protein-Interaktionen.

Mns1, Pmf-1, AIP1 und TSG101 wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und an Glutathion-Sepharose gebunden. Anschließend wurde die Bindung mit *in vitro*-translatiertem, [<sup>35</sup>S]-Methionin markiertem AATF untersucht. Als Negativkontrolle wurde jeweils GST verwendet.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die mit dem Zwei-Hybrid-System identifizierten Protein-Protein-Interaktionen weiter charakterisiert. An dieser Stelle wurde entschieden, das Hauptaugenmerk auf die Interaktion von AATF mit TSG101 zu legen. Die Interaktion mit TSG101 konnte *in vitro* am deutlichsten bestätigt werden. Des weiteren ist für TSG101 eine funktionelle Interaktion mit NR beschrieben (Watanabe *et al.*, 1998; Hittelman *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999). Da AATF drei LXXLL-Motive besitzt, welche charakteristisch sind für Koaktivatoren von NR, gab es außerdem einen direkten Hinweis auf einen funktionellen Zusammenhang der beiden Proteine.

Für die anderen Interaktionen von AATF mit Mns1, Pmf-1 und AIP1 wurden lediglich die ersten Schritte einer weitgehenden Charakterisierung durchgeführt.

### 4.4. Mns1 als potentieller Interaktionspartner von AATF

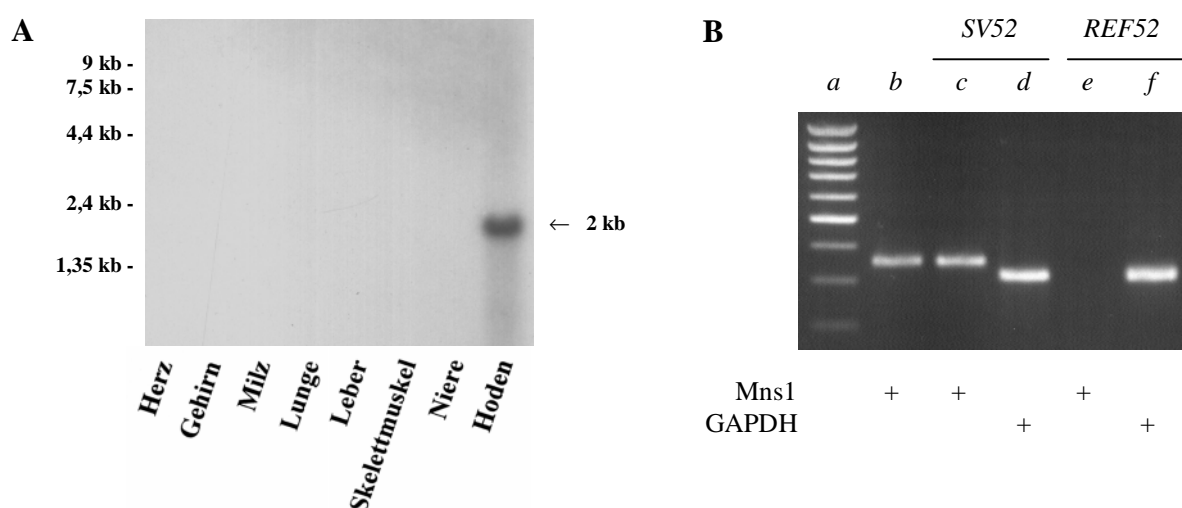
#### 4.4.1. Mns1, ein Mitglied der *Intermediate Filament*-Familie.

Mns1 (*Meiosis-specific nuclear structural protein 1*) wurde erstmals aufgrund seiner Homologie zu Lamin B identifiziert. Lamin B ist ein Strukturprotein, das mit der inneren Zellkernmembran assoziiert ist, und eine Funktion in der Stabilisierung der Zellkernstruktur hat (Gerace & Blobel, 1980). Mns1 ist ein Protein von etwa 60 kDa, dessen Expression nur in Spermatozyten nachgewiesen werden konnte und im das Pachytenstadium der meiotischen Prophase auftritt (Furukawa *et al.*, 1994). Des weiteren besitzt Mns1 Strukturhomologien mit

den sogenannten *Intermediate Filament(IF)*-Proteinen, einer Proteinfamilie, die für die Stabilisierung der intrazellulären Strukturen zuständig ist. IF-Proteine bilden ein Netzwerk zwischen Zelloberfläche und Zellkern, und stellen eine dynamische Verbindung zwischen Kernmatrix, Aktinfilamenten und extrazellulärer Matrix her (Übersicht bei Quinlan *et al.*, 1995). Transiente Expressionsanalysen mit einem GFP-Fusionsprotein von Mns1 in COP5-Zellen ergaben eine faserartige Anlagerung von Proteinaggregaten um den Zellkern (Furukawa *et al.*, 1994). Die physiologische Rolle von Mns1 ist jedoch weitgehend unbekannt.

### 4.4.2 RNA-Expressionsanalyse von Mns1

Wie unter 4.4.1. beschrieben, wird angenommen, daß die Expression von Mns1 sich auf Spermatozyten beschränkt. Da die mit dem Zwei-Hybrid-System isolierte cDNA jedoch aus SV40-transformierten Rattenfibroblasten stammt (SV52-Zellen), wurde die gewebespezifische Expression nochmals in einem Northern Blot überprüft. In Übereinstimmung mit den veröffentlichten Daten konnte eine Expression von Mns1 ausschließlich in den Hoden nachgewiesen werden (Abbildung 5A).



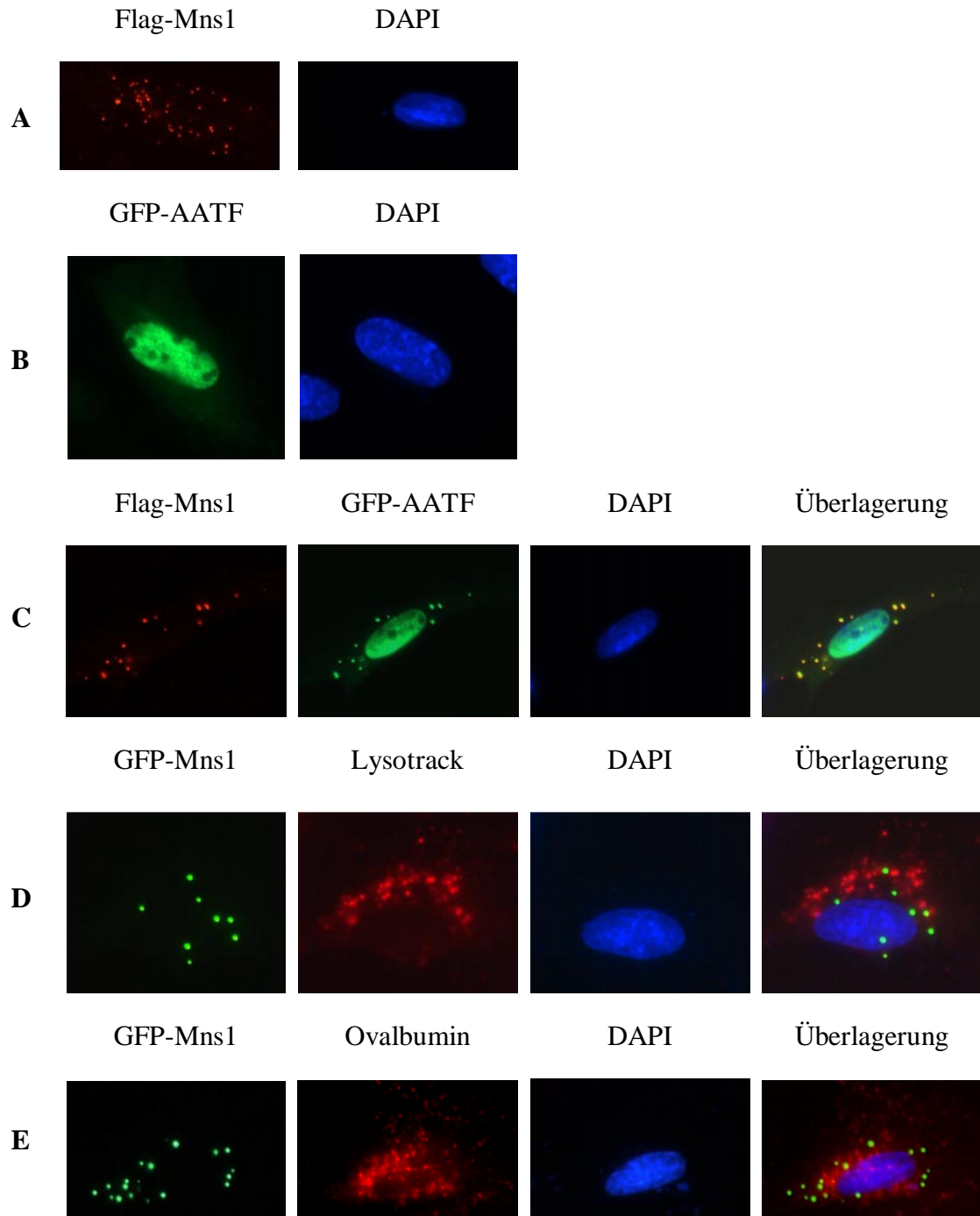
**Abbildung 5: RNA-Expressionsanalyse von Mns1.**

A) Ein mRNA-Gewebeblot wurde mit Hilfe einer [ $^{32}$ P]-markierten Sonde für Mns1 analysiert; B) RT-PCR-Reaktion mit spezifischen Oligonukleotiden für die Amplifikation von Mns1 (c und e) und GAPDH (d und f) aus SV52 (c und d) und REF52.2 (e und f). Als Kontrolle wurde das gewünschte Mns1-Fragment aus dem Plasmid pGFP-Mns1 amplifiziert (Ansatz b). Die erwartete PCR-Produkte hatten eine Größe von 336 (Mns1) und 306 (GAPDH) bp. Zur Abschätzung der Größen wurde in Spur a einen 100-bp Größenstandard aufgetragen.

Um zu untersuchen, ob die Transformation der REF52-Fibroblasten mit SV40 eine Expression von Mns1 induziert hatte, wurde mRNA aus den transformierten und aus untransformierten REF52-Zellen isoliert. Eine anschließende RT-PCR-Reaktion mit spezifischen Primern für Mns1 ergab eine Expression in den SV40-transformierten Zellen, aber nicht in den untransformierten REF52-Zellen (Abbildung 5B). Als Kontrolle wurden spezifische Oligonukleotide für GAPDH verwendet. Diese Daten belegen, daß die Expression von Mns1 durch die Transformation der Rattenfibroblasten mit SV40 induziert wurde.

### 4.4.3. Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von Mns1

Die intrazelluläre Lokalisierung von Mns1 wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Dazu wurde das mit einem Flag-Epitop ausgestattete Mns1 in REF52-Zellen exprimiert und 24h nach Transfektion einer Immunfärbung mit einem  $\alpha$ -Flag Antikörper unterzogen. Eine anschließende Analyse am Fluoreszenzmikroskop zeigte eine punktförmige zytoplasmatische Verteilung von Mns1 (Abbildung 6A). Im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten, in denen für Mns1 eine Lokalisierung an der äußeren Kernoberfläche nachgewiesen wurde (Furukawa *et al.*, 1994), zeigten die punktförmige Anfärbungen eine Verteilung über das gesamte Zytoplasma. Die Expression von Mns1 in SV52-Zellen ergab eine identische Verteilung (Daten nicht gezeigt). AATF ist nach Überexpression im Zellkern lokalisiert (Abbildung 6B). Koexpression von Flag-Mns1 mit GFP-AATF hatte keinen Einfluß auf die subzelluläre Lokalisierung von Mns1, zeigte aber eine deutliche Umverteilung von AATF: neben der Lokalisierung im Zellkern zeigte GFP-AATF eine Kolo-kalisierung mit Mns1 in den punktförmigen zytoplasmatischen Strukturen (Abbildung 6C). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die beiden Proteine tatsächlich miteinander interagieren.



**Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Mns1**

Transient transfizierte REF52.2-Zellen wurden 24h nach Transfektion einer Immunfärbung unterzogen. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. A) Expression von Flag-Mns1; B) Expression von GFP-AATF; C) Koexpression von Flag-Mns1 mit GFP-AATF; D) Anfärbung der Lysosomen mit Lysotracker; E) Anfärbung der Endosomen mit Texas-Red-gekoppeltem Ovalbumin.



Die punktförmige, zytoplasmatische Verteilung von Mns1 läßt vermuten, daß Mns1 mit Lysosomen oder Endosomen assoziiert sein könnte. Um nachzuweisen ob diese punktförmigen Anfärbungen mit lysosomalen oder endosomalen Strukturen kolokalisieren, wurden mit GFP-Mns1 transfizierte Zellen mit LysoTrack beziehungsweise Texas-Red-gekoppeltem Ovalbumin behandelt. LysoTrack ist ein basischer Farbstoff, der durch Diffusion in die Zelle gelangt und aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Lysosomen selektiv dort akkumuliert (Griffiths *et al.*, 1988). Ovalbumin wird jedoch durch Endozytose aufgenommen. Die Kopplung an einem fluoreszierenden Farbstoff ermöglicht demzufolge eine selektive Anfärbung der Endosomen (Refolo *et al.*, 1995; Swanson & Isberg, 1996).

Eine anschließende fluoreszenzmikroskopische Analyse ergab jedoch keine Kolokalisierung von Mns1 mit lysosomalen (Abbildung 6D) oder endosomalen (Abbildung 6E) Strukturen.

Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf die Interaktion von AATF mit TSG101 lag, fand keine weitere Charakterisierung der potentiellen Interaktion mit Mns1 statt.

### **4.5. Pmf-1 als potentieller Interaktionspartner von AATF**

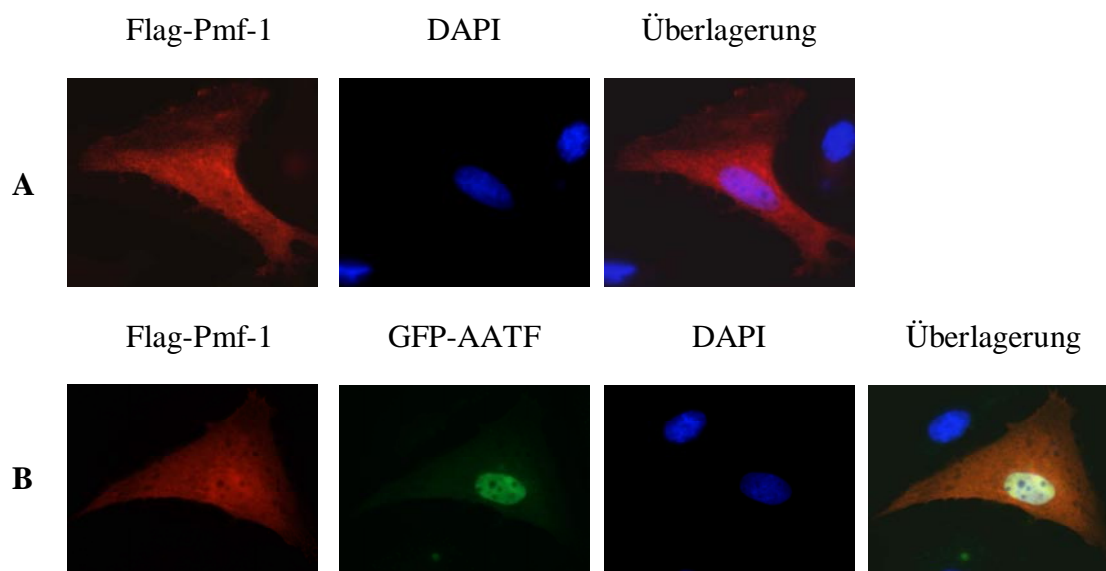
#### **4.5.1. Pmf-1, ein Koaktivator von Nrf-2**

Pmf-1 (*Polyamin Modulated Factor-1*) ist ein ubiquitär exprimiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 19,2 kDa, und spielt eine Rolle beim Abbau von Polyaminen. Pmf-1 wurde erstmals als Interaktionspartner von Nrf-2 identifiziert (Wang *et al.*, 1999), einem Transkriptionsfaktor, der die Expression der für den Katabolismus der Polyamine zuständigen Proteine induziert (Wang *et al.*, 1998). Nrf-2 bindet konstitutiv an die Promotorsequenzen der Polyaminen-induzierbaren Gene. In Anwesenheit von Polyaminen bindet Pmf-1 an Nrf-2, und aktiviert die Nrf-2-vermittelte Transkription (Wang *et al.*, 2001b).

#### **4.5.2. Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von Pmf-1**

Die intrazelluläre Lokalisierung von Pmf-1 wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurde das mit einem Flag-Epitop ausgestattete Pmf-1 in REF52.2-Zellen exprimiert. Eine Immunfärbung mit einem  $\alpha$ -Flag-Antikörper zeigte eine diffuse Verteilung

von Pmf-1 über die gesamte Zelle (Abbildung 7A). Die Koexpression von Flag-Pmf-1 mit GFP-AATF hatte keinen Einfluß auf die intrazelluläre Lokalisierung von Pmf-1 oder AATF, das nach wie vor im Zellkern vorlag (Abbildung 7B).



**Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Pmf-1**

Transient transfizierte REF52.2-Zellen wurden 24h nach Transfektion einer Immunfärbung unterzogen. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. A) Expression von Flag-Pmf-1; B) Koexpression von Flag-Pmf-1 mit GFP-AATF.

### 4.6. AIP1 als Interaktionspartner von AATF

#### 4.6.1. AIP1, ein neues Protein mit Homologie zu einem Mitglied der RNA-Transportmaschinerie aus Hefe

Bei der Suche nach Interaktionspartnern von AATF wurde eine cDNA isoliert, die für ein bisher nicht weiter charakterisiertes, hypothetisches Protein kodiert. Dieses Protein wurde in dieser Arbeit als AIP1 (AATF Interagierendes Protein 1) bezeichnet. Der cDNA-Klon hatte eine Länge von etwa 950 bp und enthielt ein offenes Leseraster für ein hypothetisches Protein von 153 AS. Dementsprechend ergab eine *in vitro*-Translation des cDNA-Klons, in dem das

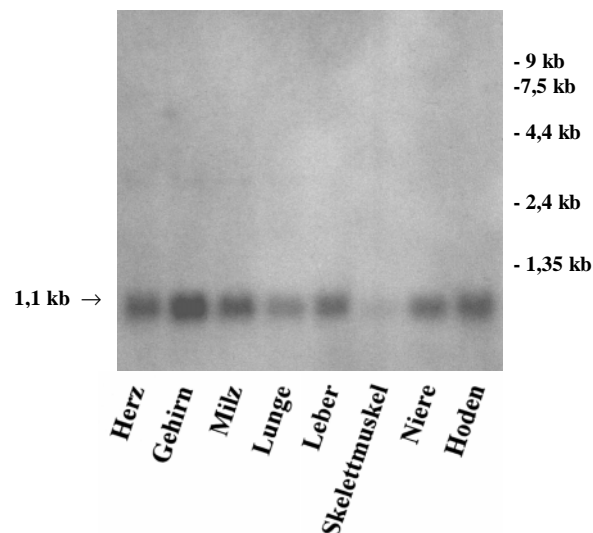
Startkodon von AIP1 vorhanden war, ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 20 kDa (Daten nicht gezeigt).

An seinem C-Terminus besitzt AIP1 einen Leucin-Zipper. Den N-terminalen Bereich bildet eine Domäne mit 45% Identität und über 60% Homologie zu She3p, einem Protein aus der Hefe, das eine Rolle beim intrazellulären Transport von RNA spielt.

### 4.6.2. RNA-Expressionsanalyse von AIP1

Um die Expression von AIP1 in verschiedenen Geweben zu untersuchen, erfolgte eine Northern Blot Analyse mit einem RNA-Gewebeblot der Firma Clontech. Als Sonde wurde eine [ $^{32}$ P]- $\alpha$ -CTP markierte cDNA von AIP1 verwendet.

Abbildung 8 zeigt eine ubiquitäre Expression von AIP1, die am höchsten ist im Gehirn und in den Hoden, und etwas niedriger in Herz, Milz, Lunge, Leber und Niere. In der quergestreiften Muskulatur wurde nur eine sehr schwache Expression beobachtet. In allen Gewebeproben wurde eine einzige Bande mit einer Größe von ca. 1,1 kb nachgewiesen.



**Abbildung 8: Expression von AIP1 in unterschiedlichen Geweben.**

Ein mRNA-Gewebeblot wurde mit Hilfe einer [ $^{32}$ P]-markierten Sonde für AIP1 analysiert.

Die cDNA-Sequenz, die aus der Hefe isoliert wurde, enthielt den gesamten kodierenden Bereich und den 3'-untranslatierten Bereich und hatte eine Größe von etwa 950 Nukleotiden.

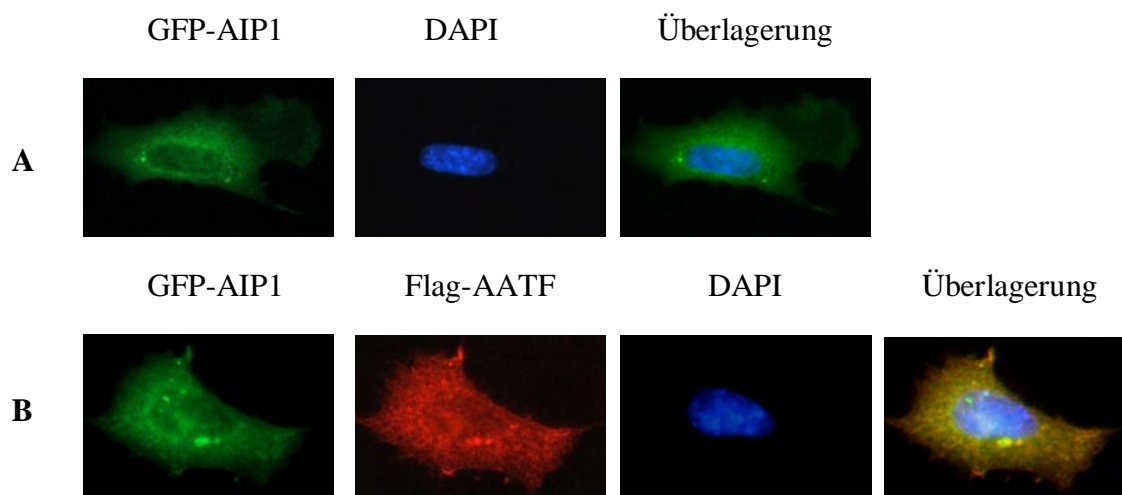
Der 5'-untranslatierte Bereich war naturgemäß in dieser Sequenz nicht vorhanden. Die Größe der im Blot nachgewiesenen Bande stimmt jedoch überein mit der Größe der homologen Maus-cDNA aus der Datenbank.

### 4.6.3. Subzelluläre Lokalisierung von AIP1

Um die intrazelluläre Lokalisierung von AIP1 zu bestimmen, wurde ein GFP-Fusionsprotein in REF52.2-Zellen exprimiert. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte eine diffuse Verteilung des Proteins im Zytoplasma (Abbildung 9A).

Um zu sehen ob die subzelluläre Lokalisierung der beiden Proteine vom jeweiligen Partner beeinflusst wird, wurde eine Koexpression von GFP-AIP1 und einem mit Flag-Epitop ausgestatteten AATF durchgeführt. Die anschließende Immunfärbung mit einem  $\alpha$ -Flag-Antikörper zeigte eine deutliche Umverteilung von AATF aus dem Zellkern in das Zytoplasma, wo es mit AIP1 kolokalisierte (Abbildung 9B).

Diese Translokation von AATF deutet auf eine *in vivo*-Interaktion der beiden Proteine.



**Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von AIP1**

Transient transfizierte REF52.2-Zellen wurden 24h nach Transfektion einer Immunfärbung unterzogen. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. A) Expression von GFP-AIP1; B) Koexpression von GFP-AIP1 und Flag-AATF.

### 4.7. TSG101 als Interaktionspartner von AATF

#### 4.7.1. TSG101, ein potentieller Tumorsuppressor

TSG101 (*Tumor Susceptibility Gene 101*) wurde erstmals identifiziert bei dem Versuch, durch zufällige Inaktivierung von Genen mögliche Tumorsuppressorgene zu identifizieren (Li & Cohen, 1996). Die funktionelle Inaktivierung von TSG101 resultierte in einer zellulären Transformation von NIH3T3-Zellen und in der Entwicklung von metastasenbildenden Tumoren in Mäusen. Des weiteren wurde in vielen primären Tumorzellen eine fehlerhafte Spleißung von TSG101 festgestellt (Gayther *et al.*, 1997; Lee & Feinberg, 1997; Sun *et al.*, 1997).

TSG101 ist ein hochkonserviertes Protein mit Orthologen u.a. in Hefe, *Drosophila*, *Xenopus laevis*, Sojabohne und Mensch. Maus TSG101 ist aus 391 AS zusammengesetzt und hat ein Molekulargewicht von etwa 43 kDa. Eine Northern-Analyse von humanen und Mäusegeweben ergab eine ubiquitäre Expression der mRNA (Li *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1998).

Am N-Terminus enthält TSG101 eine Ubc-Region, einen Bereich mit hoher Homologie zu Ubiquitin-Konjugierenden Enzymen (E2). Allerdings ist die aktive Cysteineinheit, die in E2-Enzymen mit Ubiquitin konjugiert, durch Tyrosin ersetzt. Deswegen wurde für TSG101 eine Rolle als dominant negativer Inhibitor der Ubiquitinierung postuliert (Koonin & Abagyan, 1997; Ponting *et al.*, 1997). In der Tat verhindert TSG101 die Polyubiquitinierung von z.B. MDM2 (Li *et al.*, 2001) und p21 (Oh *et al.*, 2002) und hat somit eine stabilisierende Wirkung auf diese Proteine.

Des weiteren enthält TSG101 eine Prolin-reiche Region, welche typisch für eine Klasse von Transkriptionsfaktoren ist (Mitchell & Tjian, 1989), und eine sogenannte *coiled coil*-Domäne (CC2), eine Region die verantwortlich ist für die Interaktion mit Stathmin, einem konservierten Phosphoprotein, das u.a. an der Regulierung des Zellzyklus und der Differenzierung beteiligt ist (Sobel, 1991; Maucurer *et al.*, 1995). Innerhalb der CC2-Domäne besitzt TSG101 einen Leucin-Zipper.

Den C-Terminus bildet eine  $\alpha$ -helikale Region mit einer sogenannten *Steadiness Box*. Dieser Bereich ist verantwortlich für die strenge Regulierung des intrazellulären Gehalts an TSG101 (Feng *et al.*, 2000).

Abgesehen von der Inhibierung der Polyubiquitinierung ist TSG101 an weiteren Ubiquitin-vermittelten Prozessen, wie der Aussortierung von Proteinen in den Endosomen oder der Freisetzung von Viruspartikeln in den interzellulären Raum, beteiligt.

In den Endosomen werden die Proteine, die für den Abbau in den Lysosomen bestimmt sind, durch die Einschnürung der endosomalen Membran internalisiert. Eine Voraussetzung für eine effiziente Internalisierung ist die Monoubiquitinierung dieser Proteine (Übersicht bei Hicke, 2001). TSG101 erkennt diese monoubiquitinierten Proteine und ist essentiell für deren Internalisierung (Katzmann *et al.*, 2001; Babst *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2002; Übersicht bei Dupre *et al.*, 2001).

Des weiteren ist TSG101 an der Freisetzung von Viruspartikeln in den interzellulären Raum beteiligt. Die L-Domäne (*Late*-Domäne) des retroviralen gag-Proteins ist zuständig für die Freisetzung der Viruspartikel (Gottlinger *et al.*, 1991). Eine wichtige Voraussetzung in diesem Prozeß ist die Monoubiquitinierung der L-Domäne (Garrus *et al.*, 2001). TSG101 erkennt diese monoubiquitinierten gag-Proteine und ist unentbehrlich für eine effiziente Freisetzung der Viruspartikel in den interzellulären Raum (VerPlank *et al.*, 2001; Martin-Serrano *et al.*, 2001; Myers & Allen, 2002).

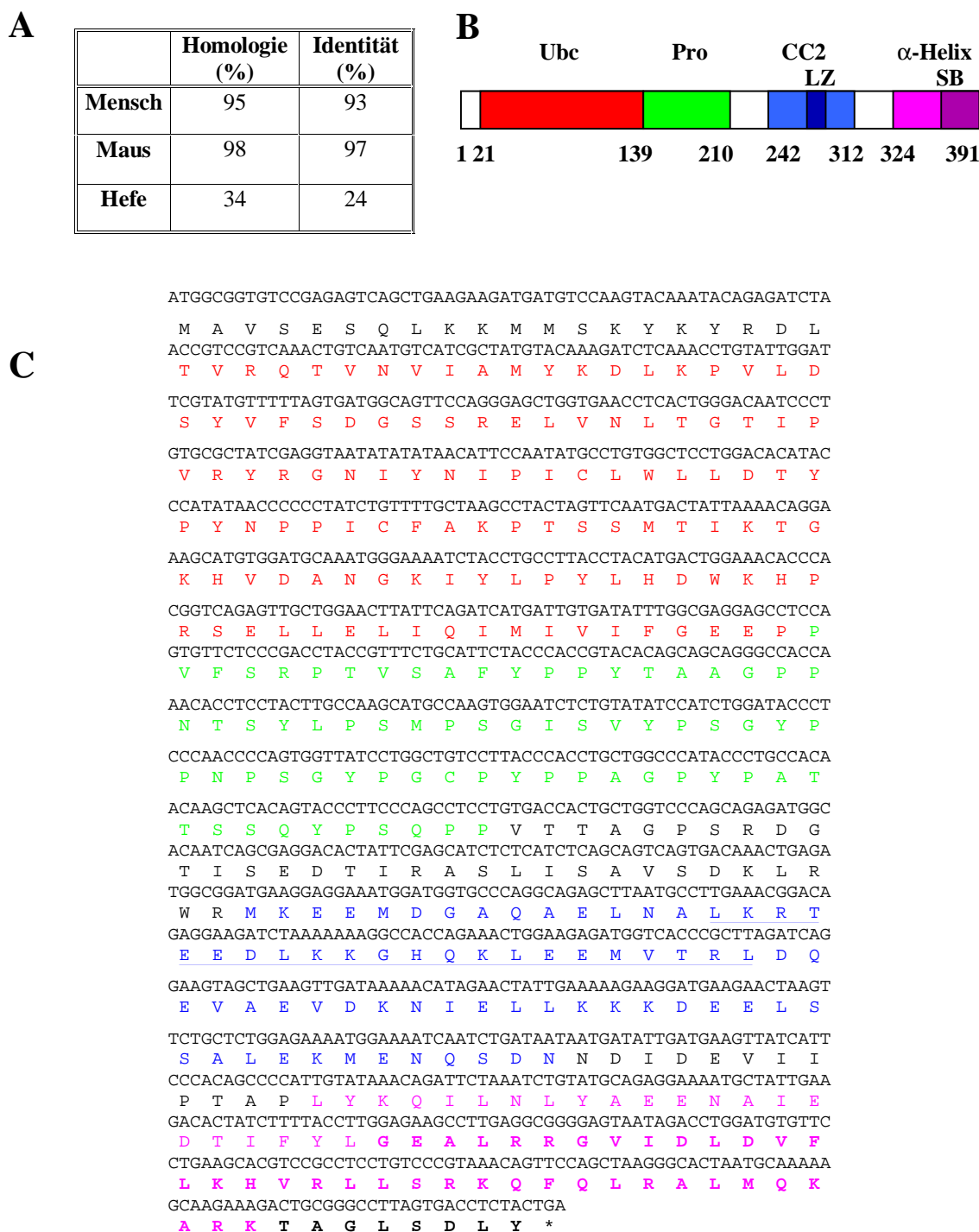
Schließlich wurde für TSG101 eine Funktion bei der Regulierung der NR-vermittelten Transkription nachgewiesen. TSG101 geht eine direkte Interaktion mit der autonomen, liganden-unabhängigen Transaktivierungsdomäne (AF-1) von NR ein (Hittelman *et al.*, 1999). Außerdem hatte die Expression von TSG101 einen negativen Effekt auf die transaktivierende Wirkung des Rezeptors (Watanabe *et al.*, 1998; Hittelman *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999). Demzufolge wurde TSG101 als Korepressor der NR identifiziert.

### **4.7.2. Isolierung des gesamten kodierenden Bereichs von TSG101 aus der Ratte**

Der isolierte cDNA-Klon von TSG101 enthielt die kodierende Sequenz für den C-terminalen Bereich des Proteins (ab AS 191, wie aus dem Vergleich mit TSG101 aus der Maus hervorging). Der 5'-untranslatierte Bereich und die kodierende Sequenz für die ersten 190 AS waren nicht vorhanden. Deshalb wurde versucht, den gesamten kodierenden Bereich mittels RT-PCR zu amplifizieren. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Rattenfibroblasten isoliert, und die mRNA mit der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die kodierenden Bereiche der cDNA-Sequenzen von TSG101 aus der Maus und aus menschlichen Zellen weisen sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende eine 100%-ige Identität auf. Aus diesen identischen Regionen wurden Oligonukleotide abgeleitet, mit denen in einer PCR-Reaktion versucht wurde, den kodierenden Bereich aus der Ratten-cDNA zu amplifizieren.

Die PCR-Reaktion ergab in der Gelelektrophorese eine einzige Bande von etwa 1200 bp. Das PCR-Produkt wurde kloniert und anschließend vollständig sequenziert. Die erhaltene cDNA-Sequenz kodiert für ein Protein aus 391 AS, mit einem hohen Grad an Homologie zu bereits bekannten TSG101-Sequenzen aus anderen Organismen (Abbildung 10A). Alle unter 4.7.1. beschriebenen Domänen von TSG101 waren auch in der Rattensequenz vorhanden (Abbildung 10B). Die gesamte Sequenz ist in Abbildung 10C dargestellt.

## 4. Ergebnisse



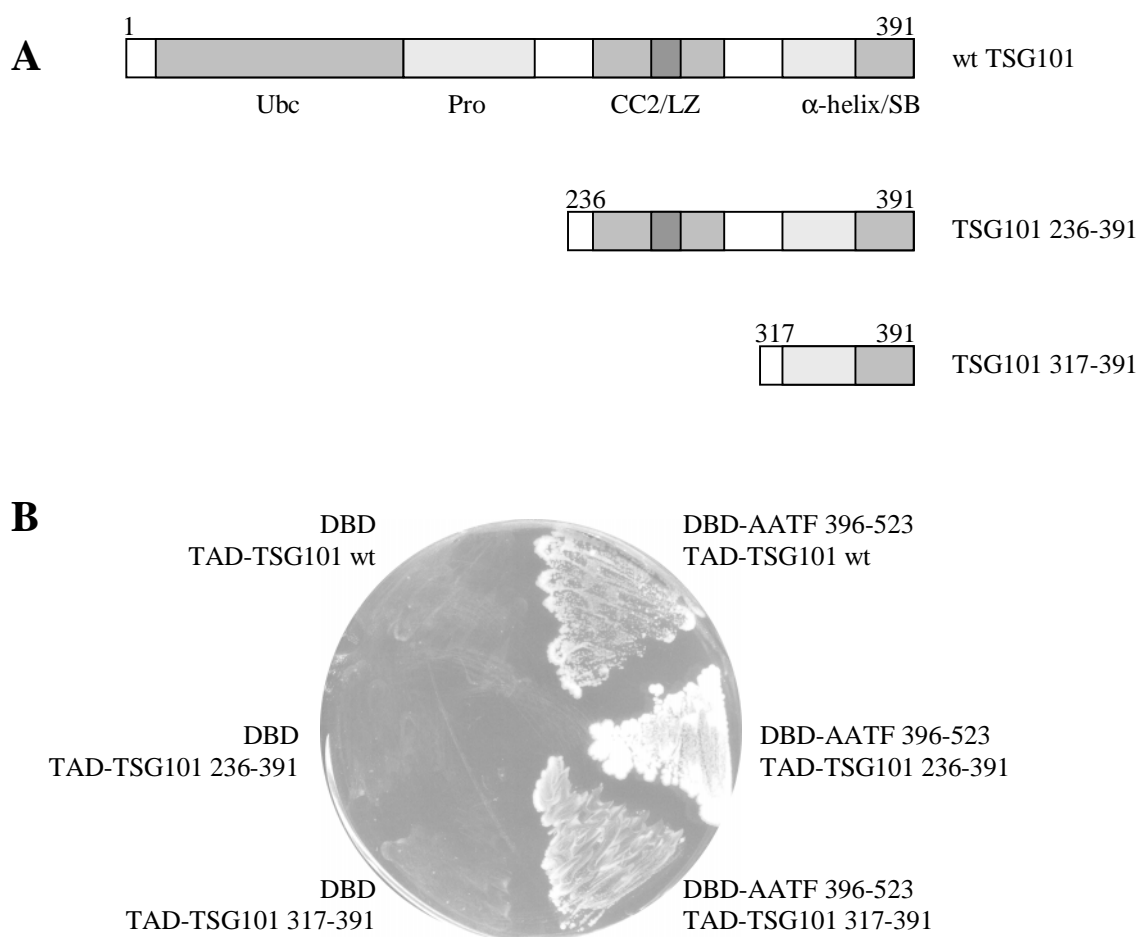
**Abbildung 10: cDNA-Sequenz von TSG101 aus der Ratte**

A) Homologie und Identität von TSG101 aus der Ratte zu bereits bekannten cDNA-Sequenzen aus anderen Organismen; B) schematische Darstellung der strukturellen Domänen von TSG101; C) Kodierender Bereich der cDNA-Sequenz von TSG101 aus der Ratte. Die Ubc-Region ist rot markiert, die Prolin-reiche Region (Pro) grün, die CC2-Domäne blau und die C-terminale,  $\alpha$ -helikale Domäne lila. Der Leucin-Zipper (LZ) ist unterstrichen, die *Steadyness Box* (SB) fett gedruckt. Die Sequenz wurde in der EMBL-Datenbank unter der Zugangsnummer AY293306 abgelegt.



### 4.7.3. Kartierung der Interaktionsdomäne in TSG101

Wie unter 4.2. beschrieben ist der C-terminale Bereich von AATF (ab AS 447) für die Interaktion mit TSG101 verantwortlich. Um festzustellen, welche Region von TSG101 für die Interaktion mit AATF verantwortlich ist, wurde eine Zwei-Hybrid-Analyse mit TSG101-Deletionsmutanten durchgeführt. Da der aus den Hefen isolierte Klon für den C-terminalen Teil des Proteins kodierte (ab AS 191), wurde die Interaktionsdomäne am C-Terminus vermutet. Die eingesetzten Deletionsmutanten von TSG101 sind in Abbildung 11A dargestellt.



**Abbildung 11: Kartierung der Interaktionsdomäne von TSG101 mit dem Zwei-Hybrid-System**

A) Schematische Darstellung der im Zwei-Hybrid-System eingesetzten Deletionsmutanten von TSG101; B) Wachstumstest der transformierten Hefezellen auf SD-Medium ohne Adenin. Die Selektion auf SD-Medium ohne Histidin ergab identische Ergebnisse.

Das im Zwei-Hybrid-System verwendete AATF-Fragment (AS 396-523) wurde als Fusionsprotein mit der DBD eingesetzt. Abbildung 11B zeigt, daß die äußerste C-terminale Region von TSG101 (ab AS 317) immer noch mit dem AATF-Fragment interagieren kann. Die zuständige Interaktionsdomäne befindet sich demzufolge im C-terminalen,  $\alpha$ -helikalen Bereich von TSG101.

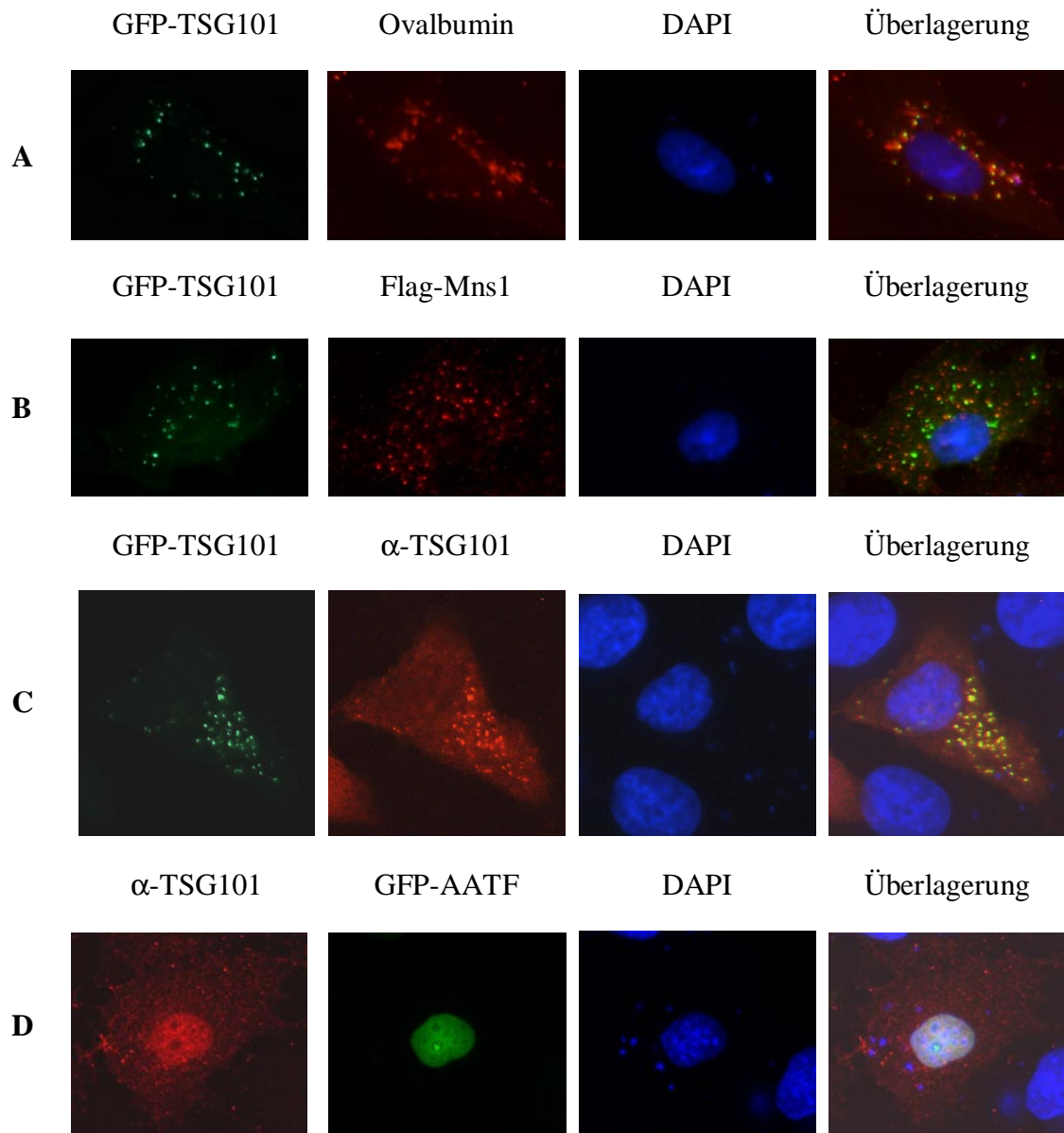
### 4.7.4. Immunfluoreszenzanalyse von TSG101

Bezüglich der intrazellulären Verteilung von TSG101 wurden zum Teil widersprüchliche Beobachtungen gemacht (Xie *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 1998). Alle veröffentlichten Daten deuten jedoch auf eine Zellzyklus-abhängige Verteilung des Proteins. In der G1-Phase liegt TSG101 diffus verteilt im Zytoplasma und im Zellkern vor. Während der Zellteilung wurde für TSG101 eine Assoziation mit der mitotischen Spindel beobachtet (Xie *et al.*, 1998).

Des weiteren wurde für TSG101 nach Stimulierung mit EGF eine Lokalisierung in den Endosomen festgestellt (Bishop *et al.*, 2002).

Um die subzelluläre Lokalisierung von TSG101 zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Dazu wurde TSG101 als GFP-Fusionsprotein in MCF7-Zellen exprimiert. Eine anschließende Untersuchung am Mikroskop ergab eine punktförmige Verteilung des Proteins im Zytoplasma (Abbildung 12A).

Da TSG101 eine wichtige Rolle bei der Aussortierung von Proteinen in den Endosomen spielt (Babst *et al.*, 2000), wurde vermutet, daß die punktförmigen, zytoplasmatischen Anfärbungen endosomale Strukturen darstellen. Um diese Annahme zu verifizieren, wurden zur Anfärbung der Endosomen, wie schon unter 4.4.3. beschrieben, die Zellen vor der Fixierung mit Texas-Red-gekoppeltem Ovalbumin inkubiert. Abbildung 12A zeigt, daß die punktförmige Verteilung von TSG101 mit den Endosomen übereinstimmt. Eine ähnliche intrazelluläre Lokalisierung von TSG101 wurde auch in anderen Zelllinien wie Hela, REF52.2 und CV-1 beobachtet (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von TSG101**

Transient transfizierte MCF7-Zellen wurden 24h nach Transfektion einer Immunfärbung unterzogen. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. A) Expression von GFP-TSG101 und Anfärbung der Endosomen mit Texas-Red-gekoppeltem Ovalbumin; B) Koexpression von GFP-TSG101 und Flag-Mns1. Immunfärbung erfolgte mit einem anti-Flag-Antikörper; C) Expression von GFP-TSG101 und Immunfärbung mit einem anti-TSG101-Antikörper; D) Koexpression von Flag-TSG101 und GFP-AATF mit anschließender Immunfärbung mit einem TSG101-spezifischen Antikörper.

Da Mns1 auch eine punktförmige Verteilung im Zytoplasma aufweist, aber für Mns1 keine Kolokalisierung mit den angefärbten endosomalen Strukturen beobachtet werden konnte (siehe 4.4.3.), wurden als Kontrolle TSG101 und Mns1 koexprimiert. Abbildung 12B zeigt, daß die punktförmigen Verteilungen von TSG101 und Mns1 nicht miteinander übereinstimmen. Diese Beobachtungen bestätigen nochmal, daß Mns1 nicht mit den endosomalen Strukturen kolokalisiert.

Um zu überprüfen, ob das endogene TSG101 eine ähnliche intrazelluläre Verteilung aufweist, wurde eine Immunfärbung mit einem spezifischen Antikörper gegen TSG101 durchgeführt. Obwohl die Anwesenheit des endogenen TSG101 in einem Western Blot nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt), konnte eine spezifische Immunfärbung des zelleigenen TSG101 jedoch nicht erzielt werden. Als Grund hierfür wird der niedrige Gehalt an endogenem Protein vermutet. Die Immunfärbung mit dem  $\alpha$ -TSG101 Antikörper ergab jedoch zusätzliche Informationen über die Verteilung des ektopisch exprimierten Proteins. Abgesehen von der Lokalisierung in den Endosomen zeigten die mit GFP-TSG101 transfizierten Zellen eine zusätzliche, diffuse Verteilung von TSG101 über die gesamte Zelle (Abbildung 12C). Die Anwesenheit von TSG101 im Zytoplasma und im Zellkern konnte in der GFP-Fluoreszenz nicht eindeutig festgestellt werden, wahrscheinlich wegen einer Überstrahlung durch die helle Fluoreszenz in den Endosomen.

In einem nächsten Schritt wurden AATF und TSG101 koexprimiert. Abbildung 12D zeigt, daß die Expression von TSG101 keinen Einfluß auf die intrazelluläre Lokalisierung von AATF hat, das nach wie vor im Zellkern vorlag. TSG101 zeigte jedoch eine veränderte Verteilung. Abgesehen von der Anwesenheit von TSG101 in den Endosomen und einer leichten Anfärbung des Zytoplasmas, wurde nach Koexpression mit AATF eine deutliche Anreicherung von TSG101 im Zellkern beobachtet. AATF rekrutiert demzufolge TSG101 in den Zellkern.

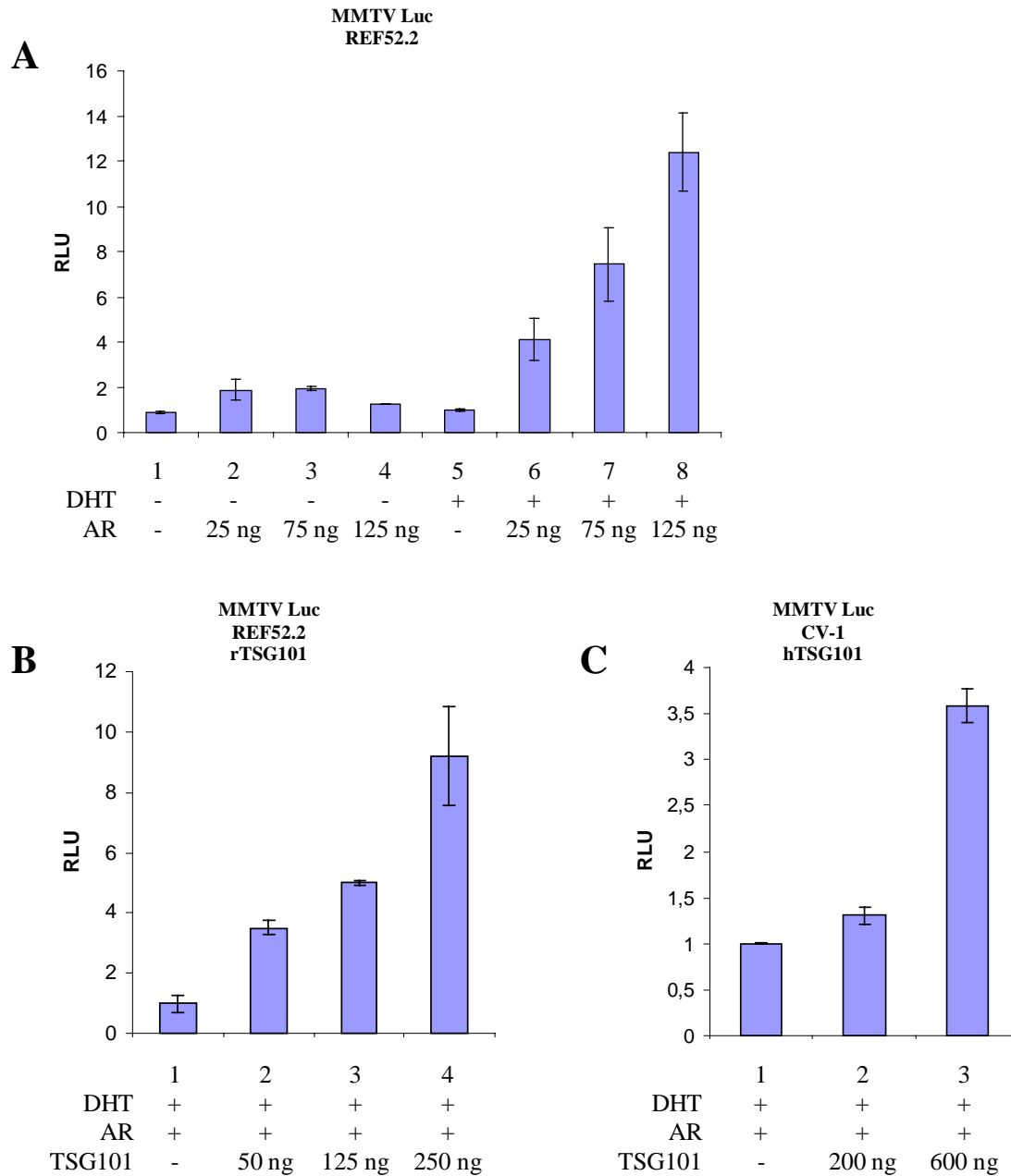
### 4.7.5. TSG101 stimuliert die AR-vermittelte Transkription

Für das humane TSG101 wurde ein negativer Einfluß auf die NR-vermittelte Transkription beschrieben. TSG101 geht eine direkte Interaktion mit NR ein (Hittelman *et al.*, 1999), und zeigt in CV-1-Zellen einen inhibierenden Effekt auf die von AR und GR induzierte Transkription (Hittelman *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999). Da AATF drei LXXLL-Motive besitzt, welche charakteristisch sind für viele Koaktivatoren der NR (Heery *et al.*, 1997), und mit TSG101 ein Interaktionspartner von AATF identifiziert wurde, der an der Regulierung der NR-vermittelten Transkription beteiligt ist, lag die Vermutung nahe, daß auch AATF eine Rolle bei der von NR induzierten Transkription spielen könnte.

Um einen Effekt von AATF und TSG101 auf die Transaktivierung von NR zu analysieren, wurden transiente Reportergenanalysen durchgeführt. Dabei wurden die Untersuchungen zunächst auf den AR beschränkt. Um die transaktivierende Wirkung des AR zu vermitteln, wurde der MMTV-Promoter (*Mouse Mammary Tumor Virus*) in Verbindung mit dem Luciferasegen als Reporter verwendet. Dieser virale Promotor wird vom AR und GR aktiviert. In Anwesenheit von Testosteron bindet der AR den Promotor und aktiviert dessen Transkription (Otten *et al.*, 1988). Um die Transkription zu quantifizieren, wurde am 3'-Ende des Promotors ein Luciferase-Reportergen angebracht. Die Aktivität der Luciferase kann in einem Luminometer gemessen werden und ist proportional zur Aktivität des Promotors. Um die AR-vermittelte Transkription zu induzieren, wurde Dihydrotestosteron (DHT) verwendet, ein Testosteronderivat, das eine zehnfach effizientere Induktion des AR bewirkt als Testosteron (Deslypere *et al.*, 1992).

Zunächst wurde das Reportersystem etabliert. Abbildung 13A zeigt den Effekt des AR auf die Aktivierung des MMTV-Promotors. In Abwesenheit von Testosteron hatte die Expression des AR keinen deutlichen Einfluß auf die Transkription. Nach Induktion mit DHT fand jedoch eine deutliche Steigerung der Transaktivierung statt. Der AR zeigte eine dosisabhängige Aktivierung des Promotors. Dabei wurde eine über zwölfwache Steigerung der Luciferaseaktivität beobachtet.

## 4. Ergebnisse



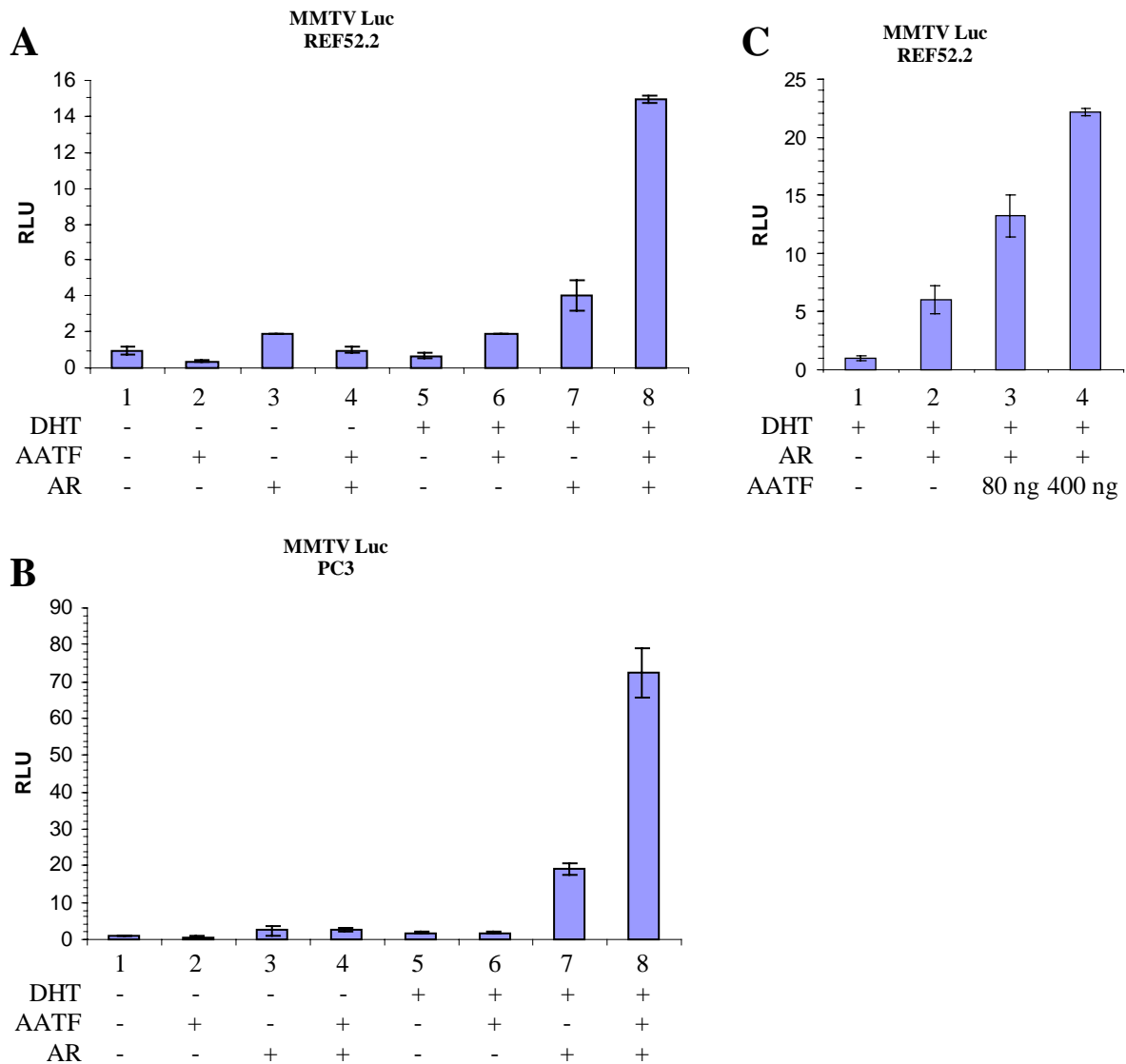
**Abbildung 13: Effekt von TSG101 auf AR-vermittelte Transkription.**

A) REF52.2-Zellen wurden mit 350 ng MMTV-Luc und den angegebenen Mengen pFlag-AR transfiziert. Die relative Luciferaseaktivität (RLU) ist normiert auf die Aktivität ohne AR in Anwesenheit von DHT; B) REF52.2-Zellen wurden mit 350 ng MMTV-Luc, 100 ng pFlag-AR und den angegebenen Mengen pFlag-TSG101 transfiziert. C) Identisch mit B), aber in CV-1-Zellen und mit einem Expressionsvektor für das humane TSG101 (hTSG101) anstelle dessen aus der Ratte (rTSG101). Die Induktion mit DHT erfolgte jeweils für 16h.

In einem nächsten Schritt wurde TSG101 in die Transaktivierungsexperimente mit einbezogen. Im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten wurde für TSG101 jedoch eine aktivierende Wirkung auf die AR-vermittelte Transkription festgestellt (Abbildung 13B). Die Zugabe von steigenden Mengen an TSG101 ergab eine dosis-abhängige, bis zu neunfache Steigerung der Luciferaseaktivität. Um auszuschließen, daß die von den veröffentlichten Daten abweichenden Beobachtungen auf zelltyp-spezifische Eigenschaften der verwendeten Empfängerzellen oder auf artspezifischen Unterschieden zwischen dem TSG101 aus Mensch und dem aus der Ratte beruhen, wurde der Transaktivierungsversuch in CV-1-Zellen statt REF52.2-Zellen, und mit humanem TSG101 statt aus der Ratte wiederholt. Das Ergebnis blieb jedoch unverändert (Abbildung 13C). Obwohl durch die niedrigere Transfektionseffizienz der CV-1-Zellen höhere Mengen an TSG101 eingesetzt werden mußten, und die Stimulierung nicht ganz so hoch war wie in den REF52.2-Zellen, wurde eine deutliche Steigerung der Luciferaseaktivität beobachtet. Die Gründe für die Abweichungen zwischen den veröffentlichten Daten über die inhibierende Wirkung von TSG101, und der hier beschriebenen Aktivierung des AR, sind unklar.

### **4.7.6. Identifizierung von AATF als Koaktivator der AR-vermittelten Transkription**

Um zu untersuchen ob auch AATF einen Einfluß auf die AR-vermittelte Transkription hat, wurde in einem nächsten Schritt AATF in die Transaktivierungsversuche mit einbezogen. Abbildung 14A zeigt, daß AATF die von Testosteron induzierte Transaktivierung des AR stimuliert. In Abwesenheit von Testosteron verursachten weder AATF noch der AR eine deutliche Expression des Luciferasereportergens (Säulen 2 respektive 3). Auch die Koexpression vom AR mit AATF hatte keinen Effekt auf die Transkription des MMTV-Promotors (vgl. Säulen 1-4). In Anwesenheit von DHT resultierte die Expression vom AR, wie erwartet, in einer deutlichen Steigerung der Transkription (vgl. Säulen 5 und 7). Die Koexpression des AR mit AATF führte zu einer weiteren Steigerung der Luciferaseaktivität um den Faktor 3,5 (vgl. Säulen 7 und 8).



**Abbildung 14: Einfluß von AATF auf die AR-vermittelte Transkription**

A) REF52.2-Zellen wurden mit 350 ng MMTV-Luc, 125 ng Flag-AR und 400 ng Flag-AATF transfiziert, wie angegeben. Die RLU ist normiert auf die Aktivität ohne AR und ohne AATF, in Abwesenheit von DHT; B) Identisch mit A), nur in PC3-Zellen statt in REF52.2-Zellen. C) REF52.2-Zellen wurden transfiziert mit 350 ng MMTV-Luc, 125 ng Flag-AR und den angegebenen Mengen an Flag-AATF. Die Induktion mit DHT erfolgte jeweils für 16h.

Interessanterweise resultierte die Expression von AATF alleine in einer Verdopplung der Luciferaseaktivität (vgl. Säulen 5 und 6), die vermutlich auf die Anwesenheit von endogenem AR zurückzuführen ist. Um dies zu verifizieren, wurden die Experimente in PC3-Zellen, einer Prostatakarzinomzelllinie ohne endogenen AR (Mulholland *et al.*, 2002), wiederholt

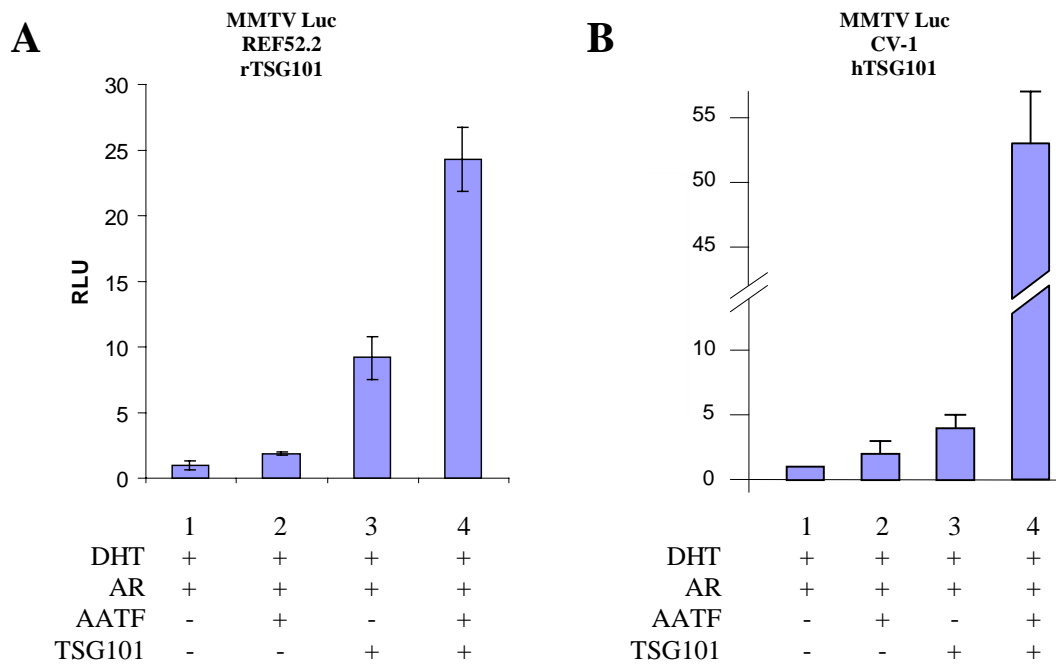


(Abbildung 14B). Die Expression von AATF ergab in dieser Zelllinie keine hormonabhängige Steigerung der Transkription (vgl. Säulen 5 und 6), was darauf hinweist, daß AATF alleine die Transkription des MMTV-Promotors nicht initiiert, aber die AR-vermittelte Transaktivierung stimuliert. AATF wirkt demzufolge als spezifischer Koaktivator der AR-induzierten Transkription. In einem nächsten Versuch wurden zunehmende Mengen an Expressionsplasmid für AATF in dem Transaktivierungsversuch eingesetzt. Abbildung 14C zeigt, daß die Stimulation der AR-vermittelten Transkription abhängig ist von der Konzentration an AATF.

### **4.7.7. AATF und TSG101 kooperieren in der Aktivierung der AR-vermittelten Transkription**

Um zu untersuchen, ob AATF und TSG101 in ihrer aktivierenden Wirkung auf die AR-vermittelte Transkription mit einander kooperieren, wurden beide Proteine zusammen in einem Transaktivierungsversuch eingesetzt. Das Experiment wurde zunächst in REF52.2-Zellen durchgeführt. Abbildung 15A zeigt, daß die eingesetzte Menge AATF die AR-vermittelte Transkription verdoppelt (vgl. Säule 1 und 2). Die Expression von TSG101 resultierte in einer neunfachen Steigerung der Luciferaseaktivität. Die Zugabe von sowohl AATF als auch TSG101 bewirkte dagegen eine fast 25-fache Aktivierung der Transkription (vgl. Säule 1 und 4).

Auch hier wurden die Beobachtungen nochmals in CV-1-Zellen mit humanem TSG101 verifiziert (Abbildung 15B). In diesem Experiment resultierte die Expression von AATF in einer Verdopplung der Luciferaseaktivität, TSG101 verursachte eine vierfache Verstärkung, während die Koexpression von AATF und TSG101 eine über 50-fache Steigerung der AR-induzierten Transkription ergab. Die Erhöhung der Transaktivierung nach Koexpression von AATF und TSG101 war deutlich höher als der additive Effekt der beiden Proteine alleine. Dies deutet darauf hin, daß AATF und TSG101 eine funktionelle Kooperation bei der Stimulierung der AR-vermittelten Transkription eingehen.

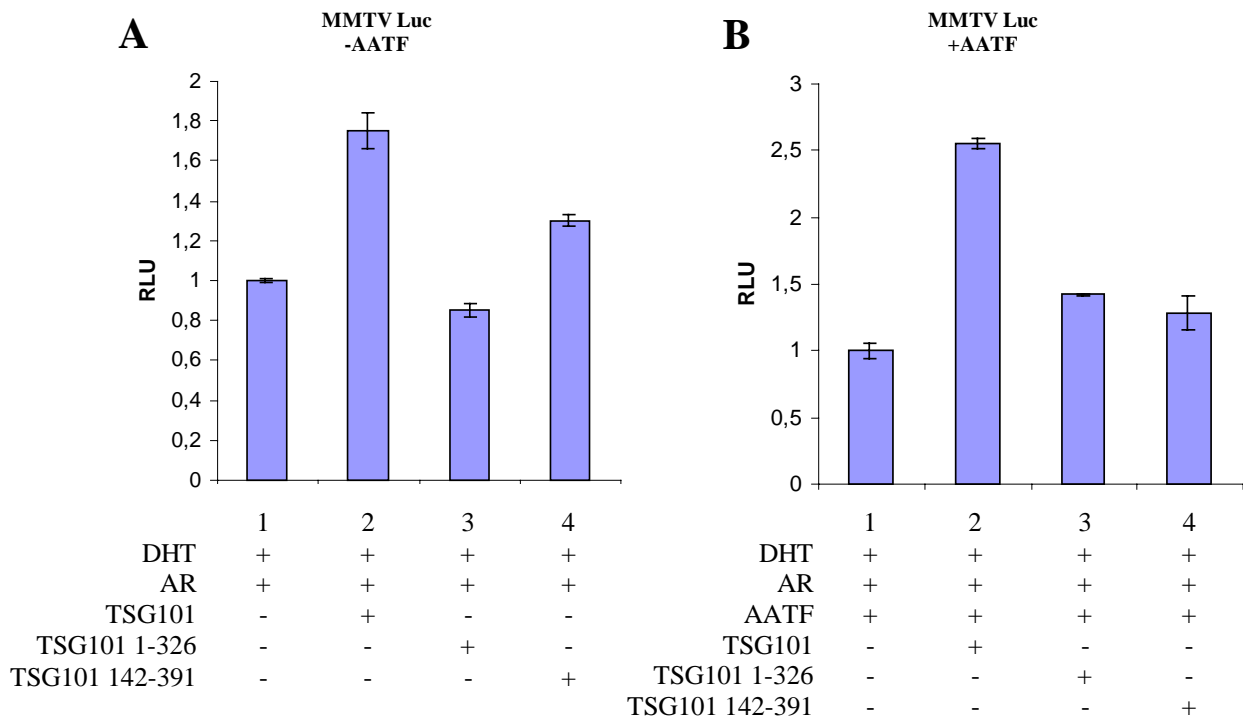


**Abbildung 15: Kooperativer Effekt von AATF und TSG101 auf die AR-vermittelte Transkription.**

A) REF52.2-Zellen wurden mit 350 ng MMTV-Luc, 100 ng pFlag-AR, 125 ng Flag-AATF und 250 ng Flag-TSG101 transfiziert, wie angegeben. Die relative Luciferaseaktivität (RLU) ist normiert auf die Aktivität ohne AATF und TSG101; B) Identisch mit A), nur in CV-1-Zellen und mit einem Expressionsvektor für das humane TSG101 (hTSG101) statt TSG101 aus der Ratte (rTSG101). Die Induktion mit DHT erfolgte jeweils für 16h.

#### 4.7.8. Die Ubc-Domäne und der C-terminale, $\alpha$ -helikale Bereich von TSG101 sind erforderlich für eine effiziente Koaktivierung der Transkription

Um zu ermitteln, welche Bereiche von TSG101 für eine effiziente Stimulierung der AR-vermittelten Transkription notwendig sind, wurden Deletionsmutanten erzeugt und in Transaktivierungsversuchen eingesetzt. Dazu wurden zum einen die N-terminale Ubc-Region (AS 1-141 in Konstrukt TSG101 142-391), zum anderen die C-terminale,  $\alpha$ -helikale Domäne (AS 327-391 im Konstrukt TSG101 1-326), die für die Interaktion mit AATF zuständig ist, entfernt.



**Abbildung 16: Transaktivierende Wirkung von TSG101-Deletionsmutanten.**

Rat1-Zellen wurden mit 350 ng MMTV-Luc, 100 ng pFlag-AR, 150 ng Flag-AATF, 500 ng Flag-TSG101 und 500 ng der TSG101-Deletionsmutanten transfiziert, wie angegeben. Die relative Luciferaseaktivität (RLU) ist normiert auf die Aktivität ohne TSG101. A) Effekt der TSG101-Mutanten ohne ektopisch exprimiertes AATF; B) nach Koexpression mit AATF. Die Induktion mit DHT erfolgte jeweils für 16h. Der TSG101 1-326 Deletionsmutante fehlt die C-terminale,  $\alpha$ -helikale Domäne, in TSG101 142-391 wurde die Ubc-Region entfernt.

Das Experiment wurde sowohl ohne als auch mit ektopisch exprimiertem AATF durchgeführt, um zu sehen in wie weit die beobachteten Effekte von AATF abhängig waren. In Abwesenheit von ektopisch exprimiertem AATF zeigten beide Deletionsmutanten eine stark eingeschränkte Koaktivierung (Abbildung 16A). Die Expression von Wildtyp TSG101 resultierte in diesem Experiment in einer fast 1,8-fachen Steigerung der Luciferaseaktivität. Die Deletionsmutante, in der die Ubc Region fehlt, zeigte eine deutliche Einschränkung der Koaktivierung (1,3-fach). Noch stärker war der Effekt der C-terminale Deletionsmutante. Dieser Mutante fehlt die Interaktionsdomäne für AATF. Ihre koaktivierende Wirkung ging völlig verloren (vgl. Säule 1 und 3). Dies könnte bedeuten, daß die Interaktion von TSG101

mit dem endogenen AATF unabdingbar ist für eine effiziente Stimulierung der AR-vermittelte Transkription.

Nach Koexpression mit AATF wurden ähnliche Beobachtungen gemacht (Abbildung 16B). Während Wildtyp TSG101 eine 2,5-fache Steigerung der Luciferaseaktivität bewirkte, konnten beide Mutanten die Aktivität des AR nicht oder nur in geringem Maße stimulieren.

Aus den hier beschriebenen Beobachtungen geht hervor, daß sowohl die Ubc-Domäne als auch die C-terminale,  $\alpha$ -helikale Region von TSG101, die für die Interaktion mit AATF zuständig ist, für eine effiziente Stimulierung der AR-vermittelten Transaktivierung unabdingbar sind.

### **4.7.9. TSG101 aktiviert die AR-vermittelte Transkription durch die Regulierung des Ubiquitinierungszustandes**

Die inaktive Ubc-Domäne gab Anlaß zur Spekulation, daß TSG101 ein negativer Regulator Ubiquitin-abhängiger Prozesse sein könnte (Koonin & Abagyan, 1997; Ponting *et al.*, 1997). Tatsächlich hat TSG101 eine regulierende Wirkung auf die Ubiquitinierung verschiedener Proteine. So steigert TSG101 z.B. die Stabilität von MDM2 und p21<sup>Cip1/WAF1</sup>, wahrscheinlich durch die Unterdrückung ihrer Polyubiquitinierung, und damit des Proteasomen-vermittelten Abbaus (Li *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2002). Des weiteren spielt TSG101 eine wichtige Rolle bei der Sortierung von Proteinen in den späten Endosomen (Babst *et al.*, 2000), und bei der Freisetzung von Viruspartikeln in den interzellulären Raum (VerPlank *et al.*, 2001; Martin-Serrano *et al.*, 2001; Myers & Allen, 2002). Eine entscheidende Funktion bei diesen Prozessen scheint dabei die inaktive Ubc-Region zu tragen. Obwohl das aktive Zentrum dieser Region eine Punktmutation trägt und deswegen TSG101 nicht als funktionelle Ubiquitin-Konjugase agieren kann, besteht immer noch eine Affinität für Ubiquitin (Bishop *et al.*, 2002).

Die Notwendigkeit der Ubc-Region für eine effiziente AR-vermittelte Transkription ließ vermuten, daß auch die transaktivierende Wirkung von TSG101 durch einen eventuellen Einfluß auf das Ubiquitinsystem zustande kommen könnte.

Tatsächlich wurden in den letzten Jahren immer mehr Daten veröffentlicht, die auf einen Zusammenhang zwischen der Transaktivierung von Transkriptionsfaktoren und ihrer Ubiquitin-vermittelten Degradierung in den 26S-Proteasomen hindeuten. So besteht für viele natürliche und chimäre Transkriptionsfaktoren ein umgekehrter Zusammenhang zwischen ihrer transaktivierenden Wirkung und ihrer Stabilität (Molinari *et al.*, 1999). Außerdem überlappt die Sequenz, die für die Degradierung der Transkriptionsfaktoren in den Proteasomen zuständig ist, mit der Transaktivierungsdomäne (Salghetti *et al.*, 2000). Für NR wurde festgestellt, daß der Abbau des Rezeptors in den Proteasomen essentiell ist für die Aktivierung der Transkription (Lonard *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2002; Gianni *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002). Dies erscheint zunächst paradox. Jedoch scheint die Kopplung von Degradierung und Transaktivierung ein Mittel zu sein, um signal- oder hormoninduzierte Transkription zu begrenzen (Thomas & Tyers, 2000; Tansey, 2001).

Um einen Einfluß von Ubiquitin auf die AR-vermittelte Transkription zu analysieren, wurde in einem ersten Schritt untersucht, ob der AR nach Induktion mit Testosteron ubiquitiniert wird.

Ubiquitinierte Proteine sind sehr instabil. Nach dem Aufschluß der Zelle werden sie sehr schnell von zelleigenen Proteasen abgebaut. Diese proteolytischen Prozesse können nur sehr begrenzt von Proteaseinhibitoren verhindert werden, und machen einen immunologischen Nachweis mittels Immunpräzipitation nahezu unmöglich. Um dies zu umgehen, wurde ein Expressionsplasmid für ein mit einem 6xHistidin-Epitop ausgestattetes Ubiquitin verwendet (His-Ubiquitin)(Ward *et al.*, 1995). Die Anwesenheit eines Histidin-Epitops ermöglicht die Isolierung der ubiquitinierten Proteine mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie, auch unter denaturierenden Bedingungen (Treier *et al.*, 1994).

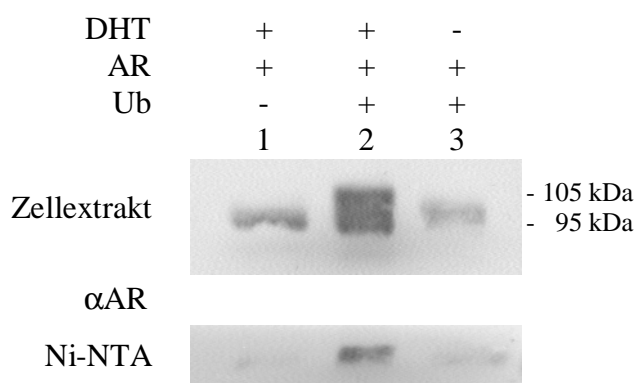
Zunächst wurden MCF7-Zellen mit Expressionsvektoren für den AR und His-Ubiquitin transfiziert. Um den intrazellulären Abbau der ubiquitinierten Proteine zu verhindern, wurde der Proteasomeninhibitor MG132 zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen in einem denaturierenden Puffer aufgeschlossen und die Zellextrakte im Western Blot mit einem anti-AR-Antikörper analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

In Abwesenheit von überexprimiertem His-Ubiquitin wurde für den AR im Western Blot eine einzige Bande bei etwa 95 kDa nachgewiesen (Spur 1, oben). Diese Bande entspricht der erwarteten Größe des AR.

## 4. Ergebnisse

Nach Koexpression mit Ubiquitin tauchte eine zusätzliche Bande um die 105 kDa auf (Spur 2). Diese Bande könnte von der Größe her dem monoubiquitinierten AR entsprechen. Um dies zu verifizieren, wurden die ubiquitinierten Proteine durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert und anschließend im Western Blot analysiert. Dies ergab, daß die bei 105 kDa erkannte Form des AR an die Ni-NTA-Agarose gebunden hatte. Dies bestätigt die Annahme, daß es sich bei der Bande mit erhöhtem Molekulargewicht tatsächlich um monoubiquitinierten AR handelt. Die Normalform des AR wurde nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie erwartungsgemäß nicht im Western nachgewiesen.

Polyubiquitinierte Formen des AR konnten nicht nachgewiesen werden. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich ihr rascher Abbau, der trotz Zugabe von MG132 nicht verhindert werden konnte.



**Abbildung 17: Einfluß der Expression von Ubiquitin auf den Ubiquitinierungszustand des AR**

MCF7-Zellen wurden mit 3 µg Flag-AR und 3 µg H<sub>6</sub>M-Ub transfiziert, wie angegeben. Unterschiedliche DNA-Gesamtmenngen wurden mit dem pCMV-Tag-2 Plasmid ausgeglichen. Die Induktion mit DHT erfolgte jeweils für 16h. Die Analyse des Zellextraktes (oben) und der Fraktion nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie (unten) erfolgte im Western Blot mit einem anti-AR-Antikörper.

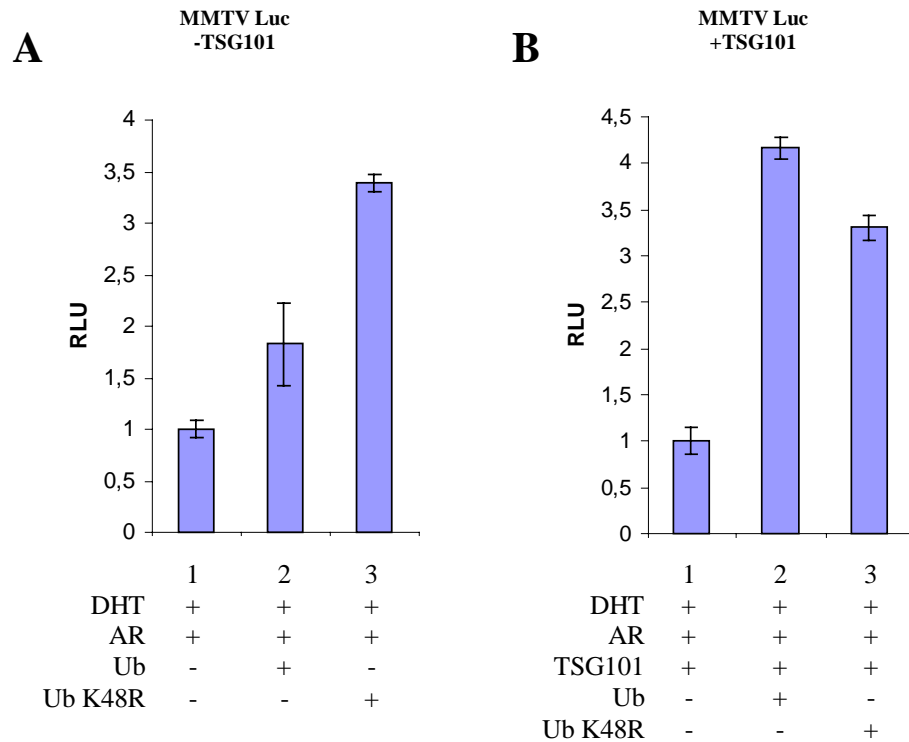
Anschließend wurde untersucht, ob die Ubiquitinierung des AR ein hormon-abhängiger Prozeß ist. Dazu wurde das Experiment ohne Induktion mit DHT durchgeführt.

In Abwesenheit von Testosteron konnte der monoubiquitinierte AR im Zellextrakt nicht nachgewiesen werden (Abbildung 17, Spur 3). Auch nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde im Western nur ein sehr schwaches Signal beobachtet. Dies deutet darauf hin, daß die Ubiquitinierung des AR von der Induktion mit Testosteron abhängig ist.

Um die Auswirkungen der Ubiquitinierung auf die Aktivität des AR zu analysieren, wurde das verwendete Expressionsplasmid für His-Ubiquitin in die Transaktivierungsversuche mit einbezogen. Die Expression von Wildtyp-Ubiquitin resultierte in einer zweifachen Steigerung der Luciferaseaktivität (Abbildung 18A, vgl. Säulen 1 und 2). Dies ist in Übereinstimmung mit veröffentlichten Befunden über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Ubiquitin (Salghetti *et al.*, 2001).

Da die polyubiquitinierte Form des AR sehr instabil ist, und nach der ektopischen Expression von Ubiquitin eine starke Anreicherung an monoubiquitiniertem AR nachgewiesen wurde, lag die Vermutung nahe, daß die monoubiquitinierte Form des AR die aktive Form sein könnte. Die Annahme, daß die Monoubiquitinierung eines Transkriptionsfaktors zu einer aktivierenden Wirkung beiträgt, wird zudem durch genetische Untersuchungen in Hefe unterstützt. In einem Ubiquitin-defekten Hefestamm zeigte der virale Transkriptionsfaktor VP16 einen Verlust seiner transaktivierenden Wirkung (Salghetti *et al.*, 2001). Die Kopplung an eine einzige Ubiquitineinheit war jedoch ausreichend um die Aktivität wieder herzustellen. Um zu verifizieren, ob die Monoubiquitinierung des AR ebenfalls ausreichend ist für eine effiziente Transaktivierung, wurde eine dominant-negative Mutante der Polyubiquitinierung (UbK48R) in den Transaktivierungsversuch eingesetzt.

Für den Proteasomen-vermittelten Abbau müssen Proteine mehrfach ubiquitiniert werden (Übersicht bei Hochstrasser, 1996). Um einen effizienten Abbau zu ermöglichen, ist es notwendig, daß eine Kette von mindestens vier Ubiquitineinheiten an das Protein gekoppelt ist (Thrower *et al.*, 2000). Die einzelnen Ubiquitineinheiten in der Polyubiquitinkette sind jeweils kovalent an Lysin48 des vorherigen Ubiquitins gebunden. In der dominant-negativen Mutante der Polyubiquitinierung ist dieser Lysin durch Arginin ersetzt. Diese Mutation verhindert somit die Entstehung von Polyubiquitinketten.



**Abbildung 18: Einfluß von Ubiquitin auf die AR-vermittelte Transkription.**

Rat1-Zellen wurden mit 500 ng MMTV-Luc, 450 ng pFlag-AR, 400 ng Flag-TSG101, 400 ng H<sub>6</sub>M-Ub oder 400 ng H<sub>6</sub>M-UbK48R transfiziert, wie angegeben. Die relative Luciferaseaktivität (RLU) ist normiert auf die Aktivität ohne Ubiquitin. Der Einfluß von Ubiquitin wurde analysiert A) ohne ektopisch exprimiertes TSG101; B) nach Koexpression mit TSG101. Die Induktion mit DHT erfolgte jeweils für 16h.

Im Gegensatz zur Wildtyp-Ubiquitin, das eine Verdopplung der Luciferaseaktivität verursachte, wurde nach der Expression der Mutante sogar eine 3,5-fache Steigerung erzielt (Abbildung 18A, vgl. Säulen 1 und 3). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Monoubiquitinierung des AR ausreichend ist für eine effiziente Transaktivierung. Außerdem bedeutet dies, daß die Aktivierung des AR auf einer Ubiquitinierung an sich beruht und nicht auf dem Ubiquitin-vermittelten Abbau in den Proteasomen.

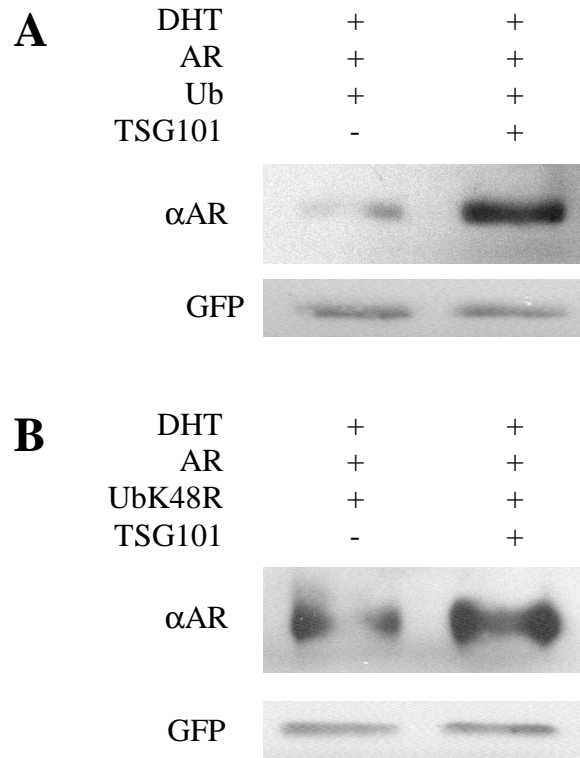


Als nächstes stellte sich die Frage nach der Rolle von TSG101 in diesem System.

Die Erhöhung der Transaktivierung durch Wildtyp-Ubiquitin wurde durch TSG101 nochmals gesteigert (Abbildung 18B). Die Expression der Ubiquitin-Mutante dagegen, führte auch in Anwesenheit von TSG101 zu einer etwa 3,5-fache Steigerung der Luciferaseaktivität. Demzufolge hat TSG101 nur einen verstärkenden Einfluß bei Wildtyp-Ubiquitin, aber nicht bei der Mutante. Darüber hinaus erhöhten TSG101 und Wildtyp-Ubiquitin die AR-vermittelte Transkription auf ein ähnliches Niveau wie die Mutante. Dies könnte bedeuten, daß TSG101 nach Koexpression mit Wildtyp-Ubiquitin den gleichen Effekt wie die Ubiquitin-Mutante bewirkt, nämlich die Stimulierung der Monoubiquitinierung durch die Unterdrückung der Polyubiquitinierung.

Um zu überprüfen, ob TSG101 überhaupt einen Einfluß auf die Ubiquitinierung des AR hat, wurde ein *in vivo*-Ubiquitinierungsversuch durchgeführt. Dazu wurden TSG101, der AR und His-Ubiquitin in MCF7-Zellen exprimiert. Anschließend wurden die ubiquitinierten Proteine mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert und mit einem anti-AR-Antikörper im Western Blot analysiert. Für die Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde dem Transfektionsansatz ein Expressionsplasmid für GFP zugefügt. Der GFP-Gehalt im Zellextrakt wurde mit einem GFP-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Abbildung 19A zeigt, daß die Expression von TSG101 zu einer deutlichen Zunahme von ubiquitiniertem AR führte. Ähnlich wie in Abbildung 17 wurden ausschließlich monoubiquitinierte Formen des AR nachgewiesen. Eine quantitative Analyse der im Blot nachgewiesenen Banden ergab, daß durch die Expression von TSG101 die Menge an monoubiquitiniertem AR um ein fünffaches erhöht wurde. Um zu verifizieren, ob die Anreicherung an monoubiquitiniertem AR, wie schon anhand der Ergebnisse der Transaktivierungsversuche vermutet wurde, auf eine von TSG101 vermittelte Unterdrückung der Polyubiquitinierung zurückzuführen ist, wurde die Ubiquitin-Mutante in dem *in vivo*-Ubiquitinierungsversuch eingesetzt (Abbildung 19B). Im Gegensatz zu den Experimenten mit Wildtyp-Ubiquitin, führte die Koexpression von TSG101 mit der Ubiquitin-Mutante nur zu



**Abbildung 19: *In vivo* Ubiquitinierungsversuch des AR**

MCF7-Zellen wurden mit 3 µg Flag-AR, 3 µg Flag-TSG101, 3 µg H<sub>6</sub>M-Ub, 3 µg H<sub>6</sub>M-UbK48R oder 1 µg pEGFP-C1 transfiziert, wie angegeben. Unterschiedliche DNA-Gesamtmenen wurden mit dem pCMV-Tag-2 Plasmid ausgeglichen. Für die Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde pEGFP-C1 zu dem Transfektionsansatz gegeben, und die Mengen an GFP im Zellextrakt analysiert. A) Histidin-markierte ubiquitinierte Proteine aus dem Zellextrakt wurden mittels Ni-NTA-Affinitätsreinigung isoliert, und anschließend im Western Blot mit einem anti-AR-Antikörper analysiert; B) identisch mit A), nur mit der Ubiquitin K48R Mutante statt mit Wildtyp-Ubiquitin. Eine elektronische Datenanalyse mit dem ImageMaster TotalLab Programm (Amersham-Pharmacia Biotech) ergab für TSG101, nach Koexpression mit Wildtyp Ubiquitin oder der K48R Mutante, eine 5-fache bzw. 1,6-fache Anreicherung des monoubiquitinierten AR.

einer geringen Erhöhung an monoubiquitiniertem AR (1,6-fach). Dies bestätigt, daß TSG101 nicht die Monoubiquitinierung an sich stimuliert, sondern eine Anreicherung an monoubiquitiniertem AR durch die Unterdrückung der Polyubiquitinierung bewirkt.

## 5. Diskussion

### 5.1. Identifizierung neuer Interaktionspartner von AATF

AATF wurde ursprünglich mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems als Interaktionspartner der Dlk/ZIP-Kinase isoliert (Page *et al.*, 1999). Zur Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß AATF die Dlk/Par-4-induzierte Apoptose unterdrückt und daß AATF in Hefe eine transaktivierende Wirkung besitzt. Über die biologische Funktion von AATF, oder über seine Wirkungsweise, lagen jedoch keinerlei Informationen vor. In der Hoffnung Einsicht zu bekommen an welchen Prozessen AATF beteiligt sein könnte, wurden mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems weitere Interaktionspartner von AATF gesucht.

Da die N-terminale saure Domäne von AATF im Zwei-Hybrid-System eine autoaktivierende Wirkung aufweist, wurde ein C-terminales Fragment (AS 396-523) als Köder verwendet. Dieses Fragment enthielt zwei der drei hochkonservierten Regionen, sowie eines von drei LXXLL-Motiven, welche charakteristisch für viele Koaktivatoren der NR sind. Dabei konnten vier Klone isoliert werden, die für potentielle Interaktionspartner von AATF kodieren. Eine Sequenzanalyse zeigte, daß es sich bei diesen Klonen um Pmf-1, Mns1, TSG101 und um eine cDNA-Sequenz, die für ein noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein kodiert, handelte. Dieser Klon wurde in dieser Arbeit als AIP1 bezeichnet. Für alle identifizierten Interaktionspartner wurde die Interaktion mit AATF nochmals in Hefe bestätigt. Des weiteren ergab eine Interaktionsstudie mit Deletionsmutanten, daß sich die Interaktionsdomäne für AIP1, Pmf-1 und TSG101 am C-Terminus zwischen AS 447 und 523 von AATF befindet. Für die Interaktion mit Mns1 sind zusätzlich die AS 396 bis 446 erforderlich.

In einem nächsten Schritt wurde versucht, die Interaktion von AATF mit den isolierten Proteinen in einem GST-Präzipitationsexperiment nachzuweisen. Dabei konnte die Interaktion von AATF mit TSG101 und AIP1 *in vitro* bestätigt werden, für Pmf-1 und Mns1 jedoch nicht.

Anschließend wurden die mit dem Zwei-Hybrid-System identifizierten Protein-Protein-Interaktionen weiter charakterisiert, wobei das Hauptaugenmerk auf der Interaktion zwischen

AATF und TSG101 lag. Für die Interaktionen von AATF mit Mns1, Pmf-1 und AIP1 wurden lediglich die ersten Schritte einer Charakterisierung durchgeführt.

### 5.2. Mns1 als potentieller Interaktionspartner von AATF

Mns1 gehört zur Superfamilie der IF-Proteine. Intermediärfilamente stellen neben Aktinfilamenten und der Mikrotubuli die dritte Komponente des Zytoskeletts dar. Sie bilden ein intrazelluläres Geflecht, und sind zuständig für eine dynamische Vernetzung verschiedener Makrostrukturen wie der Kernmatrix, der extrazellulären Matrix und der Aktinfilamente (Übersicht bei Quinlan *et al.*, 1995).

Die Expression von Mns1 ist auf Spermatozyten beschränkt und findet im Pachytenstadium der meiotischen Prophase statt (Furukawa *et al.*, 1994). In somatischen Zellen konnte bislang keine Expression von Mns1 festgestellt werden. Meiotische Zellen erleben eine grundlegende Veränderung in ihrer intrazellulären Struktur. So entsteht im Pachytenstadium z.B. eine perinukleäre Matrix, die eng mit dem Endoplasmatischen Retikulum verknüpft ist (Chemes *et al.*, 1978). Es wurde postuliert, daß Mns1 eine Rolle bei diesen strukturellen Veränderungen in der Meiose spielen könnte (Furukawa *et al.*, 1994).

Die gewebespezifische Expression von Mns1 in den Hoden wurde in dieser Arbeit bestätigt. Des weiteren wurde gezeigt, daß die Expression von Mns1 in den SV52-Fibroblasten durch die Transformation mit SV40 induziert wurde. Um eine effiziente Vermehrung zu gewährleisten, kann SV40 in der infizierten Zelle Prozesse wie den intrazellulären Transport, die Signaltransduktion oder die Adhäsion durch eine Modifizierung des Zytoskeletts beeinflussen (Brandner & Cho, 1977; Gershman & Rosen, 1978; Klawitz *et al.*, 2001; Pelkmans *et al.*, 2002). Ob es sich bei der Induktion von Mns1 durch SV40 auch um eine gezielte Veränderung der intrazellulären Struktur der Zelle handelt, die zu einer effizienten Vermehrung beiträgt, ist jedoch unklar. Allerdings muß hier berücksichtigt werden, daß Rattenzellen nicht permissiv für die SV40-Vermehrung sind, und daß lediglich die frühen Gene exprimiert werden, welche mit Transformationsprozessen in Verbindung stehen.

Die Expression in REF52-Zellen zeigte eine punktförmige zytoplasmatische Verteilung von Mns1 über das gesamte Zytoplasma. Im Gegensatz dazu zeigten veröffentlichte Daten für GFP-Mns1 eine Anreicherung in faserartigen Proteinaggregaten an der äußeren Kernoberfläche (Furukawa *et al.*, 1994). Als Grund für die unterschiedlichen Beobachtungen kommen Zelltyp-spezifische Faktoren, wie z.B. andere IF-Proteine in Frage. Die punktförmige Verteilung von Mns1 ließ eine Assoziation mit lysosomalen oder endosomalen Strukturen vermuten. Nach Anfärbung der Lysosomen bzw. Endosomen konnte jedoch keine Kolokalisation festgestellt werden. Die angefärbten Strukturen wurden nicht weiter charakterisiert.

Eine Koexpression von Mns1 mit AATF hatte keinen Einfluß auf die intrazelluläre Lokalisierung von Mns1, zeigte aber eine deutliche Relokalisierung von AATF: abgesehen von einer Anfärbung des Zellkerns zeigte GFP-AATF eine Kolokalisierung mit Mns1 in den punktförmigen zytoplasmatischen Strukturen.

Obwohl also die Interaktion zwischen AATF und Mns1 *in vitro* nicht bestätigt werden konnte, spricht die Kolokalisierung der beiden Proteine in der Immunfluoreszenzanalyse für eine Interaktion *in vivo*. Möglicherweise ist das GST-Fusionsprotein von Mns1 nicht richtig gefaltet oder wird die *in vivo* Interaktion von zusätzlichen endogenen Faktoren oder Modifikationen stabilisiert. Interessant wäre in diesem Hinblick eine eventuelle Rolle der Dlk zu untersuchen. Dlk interagiert sowohl mit AATF als auch mit Tropomyosin, einem Strukturprotein, das an Aktinfilamente bindet und diese stabilisiert (G. Page, Doktorarbeit 2000). Da Mns1 eine Region mit hoher Homologie zu Tropomyosin enthält (Furukawa *et al.*, 1994) und Mns1 *in vivo* mit AATF interagieren kann, besteht die Möglichkeit, daß Dlk eine Interaktion von AATF mit Mns1 stimuliert. Da jedoch die Expression von Mns1 auf Spermatozyten beschränkt ist und die Fluoreszenzanalyse in einer Fibroblastenzelllinie stattfand, ist eine gewisse Zurückhaltung bei der Interpretation der Daten angebracht.

### 5.3. Pmf-1 als potentieller Interaktionspartner von AATF

Der Transkriptionsfaktor Pmf-1 ist an der Regulierung des Polyaminstoffwechsels beteiligt.

Die eukaryontischen Polyamine Putreszin, Spermidin und Spermin sind kationische Alkylamine, die u.a. eine Rolle bei der Zellteilung (Ray *et al.*, 1999; Oredsson, 2003) und bei der Differenzierung spielen (Herold *et al.*, 1993; Frostesjo *et al.*, 1997). Ihr streng regulierter Metabolismus deutet auf die Wichtigkeit dieser organischen Kationen.

Ein entscheidender Schritt im Abbau der Polyamine wird von SSAT (*Spermidine/Spermine N-acetyltransferase*) katalysiert (Porter *et al.*, 1991; Alhonen *et al.*, 1998). Die Promotorregion des SSAT-Gens wird konstitutiv von dem Transkriptionsfaktor Nrf-2 gebunden (Wang *et al.*, 1998). Pmf-1 kann mit Nrf-2 interagieren und stimuliert in Anwesenheit von Polyaminen die Transkription des SSAT-Gens (Wang *et al.*, 2001b).

In dieser Arbeit wurde Pmf-1 als Interaktionspartner von AATF identifiziert. Die Expression von Pmf-1 in REF52-Zellen zeigte eine diffuse Verteilung des Proteins über die gesamte Zelle, also auch im Zellkern, was eine potentielle Interaktion mit AATF ermöglicht. Eine Koexpression von Pmf-1 und AATF zeigte jedoch keine Änderung der subzellulären Lokalisierung der beiden Proteine. Dies könnte bedeuten, daß die beiden Proteine weder *in vitro* noch *in vivo* mit einander interagieren. In diesem Fall wäre die Isolierung von Pmf-1 als Interaktionspartner von AATF ein falsch-positives Resultat. Eine andere Möglichkeit ist jedoch, daß die Interaktion von Pmf-1 mit AATF bestimmte intrazelluläre Bedingungen, wie z.B. die Anwesenheit von Polyaminen, erfordert. Aufgrund der bisher bekannten Daten über Pmf-1 ist nach einer Stimulierung mit Polyaminen eine Translokation des Proteins in den Zellkern wahrscheinlich. Auch eine eventuelle Interaktion von Pmf-1 mit AATF könnte durchaus von einer durch Polyamine induzierten Konformationsänderung stimuliert werden. Ob AATF jedoch einen Einfluß auf die Pmf-1-induzierte Transkription hat, muß durch weitere Experimente geklärt werden.

### 5.4. AIP1 als Interaktionspartner von AATF

AIP1 zählt 153 AS und besitzt an seinem C-Terminus einen Leucin-Zipper. Eine Expressionsanalyse mit einem gewebespezifischen RNA-Blot ergab für AIP1 eine ubiquitäre Verteilung, mit einer starken Expression in Gehirn und Hoden, und einer etwas niedrigeren Expression in Milz, Lunge, Herz, Leber und Niere. In der quergestreiften Muskulatur wurde nur ein sehr schwaches Signal beobachtet. In allen Geweben wurde eine einzige Bande von etwa 1,1 kb nachgewiesen. Eine Immunfluoreszenzanalyse ergab für AIP1 eine diffuse zytoplasmatische Verteilung des Proteins. AATF dagegen ist im Zellkern lokalisiert. Nach Koexpression von AATF mit AIP1 kolokalisierte AATF jedoch mit AIP1 im Zytoplasma. Diese Umverteilung von AATF bestätigt die Interaktion mit AIP1 *in vivo*.

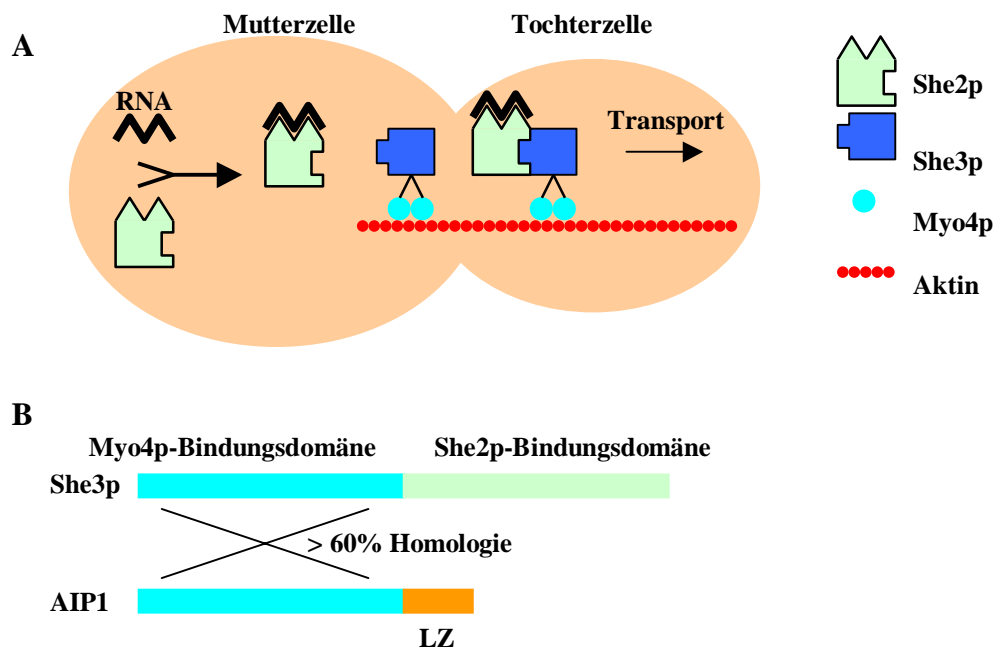
Über die Funktion von AIP1 läßt sich nur spekulieren. Den N-terminalen Bereich bildet eine Domäne mit hoher Homologie zu She3p, einem Protein aus der Hefe, das eine Rolle bei dem intrazellulären Transport von mRNA spielt.

Der intrazelluläre Transport von mRNA ist ein wichtiger Regulierungsprozeß, der in einer Vielzahl von Organismen eine wichtige Rolle spielt (Übersicht bei Lipshitz & Smibert, 2000). Durch den gezielten Transport von mRNA und eine lokale Translation können z.B. in einer bestimmten Region der Zelle hohe Konzentrationen eines Proteins produziert (Zhang *et al.*, 2001) und eventuell auf diesen Bereich oder bestimmte subzelluläre Strukturen beschränkt werden (Übersicht bei Kiebler & Desgroseillers, 2000). So sind z.B. in Neuronen der Transport von Dendrin- oder Tau-mRNA in den Dendriten respektive Axonen und eine anschließende lokale Translation dafür zuständig, daß die Verteilung von Dendrin und Tau sich auf die Dendriten bzw. Axonen beschränkt (Pinkstaff *et al.*, 2001; Aronov *et al.*, 2001).

Der Transport von mRNA findet mit Hilfe von Motorproteinen entlang den Strukturen des Zytoskeletts statt (Übersicht bei Kloc *et al.*, 2002). Die Bindung bestimmter mRNAs an diese Motorproteine erfolgt über spezifische Adapterproteine.

Das zu AIP1 homologe She3p aus der Hefe spielt eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport der Ash1-mRNA. Bei der Zellteilung von Hefen ist es von entscheidender Bedeutung, daß gewisse Informationen von der Mutterzelle an die Tochterzelle in Form von mRNA weitergegeben werden. Auf diese Weise wird beispielsweise die Erhaltung des *Mating*

*Typs*, eine Eigenschaft, die über die Paarung mit anderen Hefezellen bestimmt, sichergestellt. Dazu findet in der Tochterzelle eine erhöhte Expression von Ash1p statt. Dieser Transkriptionsrepressor inhibiert die Expression bestimmter Proteine, die einen Wechsel des *Mating Typs* verursachen können (Bobola *et al.*, 1996; Maxon & Herskowitz, 2001). Um in der Tochterzelle eine ausreichende Menge an Ash1p synthetisieren zu können, findet am Ende der Anaphase ein gezielter Transport von Ash1-mRNA von der Mutterzelle in die Tochterzelle statt (Takizawa *et al.*, 1997; Long *et al.*, 1997; Münchow *et al.*, 1999). Für diesen Transport sind die sogenannten SHE-Proteine (*Swi5p-dependent HO Expression*) zuständig (Abbildung 20A). She2p ist ein RNA-Bindeprotein, das eine direkte Bindung mit der Ash1-mRNA eingehen kann (Long *et al.*, 2000). She3p ist ein Linkerprotein zwischen She2p und Myo4p (auch She1p genannt), ein Motorprotein, das für den gezielten Transport entlang Aktinfilamente zuständig ist (Haarer *et al.*, 1994; Takizawa & Vale, 2000; Böhl *et al.*, 2000). Nachdem She2p die mRNA gebunden hat, verbindet She3p den RNA-Proteinkomplex mit dem Motorprotein Myo4p, und ermöglicht so den Transport entlang der Aktinfilamente (Böhl *et al.*, 2000).



**Abbildung 20: Die Rolle der She Proteine im mRNA-Transport in Hefe**

A) Schematische Darstellung des gezielten Transports von Ash1 mRNA; B) Struktur von She3p und AIP1.



She3p besitzt an seinem N-Terminus die Interaktionsdomäne für Myo4p. Den C-Terminus bildet die Interaktionsdomäne für She2p.

Das isolierte AIP1 zeigt am N-terminus eine Homologie von über 60% mit der Myo4p-Bindungsdomäne von She3p (Abbildung 20B). Dies läßt vermuten, daß AIP1 ebenfalls eine Verbindung zu Myosin-Motorproteinen eingehen könnte, und somit eine mögliche Funktion in intrazellulären Transportprozessen hat.

Das Hefehomolog She3p besitzt außer der N-terminalen Myo4p-Bindedomäne an seinem C-Terminus eine Region, mit der eine Verbindung zu dem RNA-Proteinkomplex hergestellt wird. Anstelle dieser Region besitzt AIP1 einen Leucin-Zipper, einer Domäne die oftmals zuständig ist für die Interaktion mit anderen Proteinen. AIP1 könnte demzufolge als Adapterprotein zwischen Motorproteinen und einer eventuellen Fracht dienen. Dabei könnte der Leucin-Zipper die Verbindung zur Fracht oder zu anderen Adapterproteinen, die mit einer Fracht verbunden sind, herstellen. Dabei kommen, abgesehen von mRNA-Proteinkomplexen, auch noch andere Frachtgüter, wie z.B. Vesikel in Frage.

Künftige Untersuchungen werden zeigen, ob AIP1 eine Funktion in intrazellulären Transportprozessen hat. Außerdem ist zu klären, ob AATF eine wichtige Komponente dieses Vorgangs ist. Tatsächlich wird eine Rolle von AATF bei intrazellulären Transportprozessen von Beobachtungen in Mäuseembryonen mit zerstörtem AATF-Lokus unterstützt. In diesen Embryonen war die Lokalisierung von  $\alpha$ -E-catenin,  $\beta$ -catenin und E-cadherin an die Plasmamembran stark beeinträchtigt (Thomas *et al.*, 2000). Des weiteren enthielten die Zellen dieser Embryonen stark vergrößerte sekretorische Vesikel, was auf einen fehlerhaften Transport an die Membran zurückgeführt wurde. Die genaue Funktion von AATF in diesem Prozeß bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

### **5.5. TSG101 als Interaktionspartner von AATF**

TSG101 (*Tumor Susceptibility Gene 101*) wurde ursprünglich als mögliches Tumorsuppressorgen identifiziert (Li & Cohen, 1996). Die Inaktivierung von TSG101 führte zur malignen Transformation von NIH3T3 Zellen. Untersuchungen der letzten Jahre zeigen jedoch, daß TSG101 auch eine wachstumsfördernde Funktion hat. So erwies sich die

Generierung einer Knockout-Mutante als embryonal letal mit dem Tag E6,5 (Ruland *et al.*, 2001). Außerdem wurden nach der Inaktivierung von TSG101 Abweichungen an mitotischen Strukturen (Xie *et al.*, 1998) sowie eine Arretierung des Zellzyklus beim Übergang von der G1- in die S-Phase beobachtet (Zhong *et al.*, 1998; Ruland *et al.*, 2001; Krempler *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2002). Dies ist vermutlich durch die regulierende Wirkung von TSG101 auf den p53-MDM2-Schaltkreis zu erklären. Die intrazelluläre Konzentrationen von p53 und MDM2 werden gegenseitig reguliert (Übersicht bei Freedman & Levine, 1999). Die Expression von MDM2 wird von dem Transkriptionsfaktor p53 aktiviert. MDM2 wiederum inhibiert die transaktivierende Wirkung von p53 und stimuliert als Ubiquitinligase dessen Degradierung. Die Expression von TSG101 stabilisiert MDM2, was zu einer Abnahme von p53 führt (Li *et al.*, 2001). Infolgedessen verursacht eine Inaktivierung von TSG101 eine Anreicherung an p53. Diese führt zur Induktion des CDK-Inhibitors p21 und damit zu einer Unterdrückung der CDK2-Aktivität, was für die Arretierung des Zellzyklus bei dem G1/S-Übergang zuständig sein könnte (Dulic *et al.*, 1994). Die Stabilisierung von MDM2 durch TSG101 beruht vermutlich auf einer unterdrückten Ubiquitinierung von MDM2.

Auch die Überexpression von TSG101 führte zu größeren Störungen bei der Regulation des Zellzyklus. Eine erhöhte Expression in Keratinozyten resultierte in einer stark beeinträchtigten DNA-Synthese während der mitotischen Zellteilung (Oh *et al.*, 2002). In Saos-2 Zellen löste die Expression von TSG101 sogar Apoptose aus (Zhong *et al.*, 1998). Diese Daten belegen, daß die intrazelluläre Konzentration an TSG101 von entscheidender Bedeutung ist für eine intakte Funktionalität der Zelle. Deshalb ist ein sehr genauer posttranslatonaler Regulationsmechanismus dafür zuständig, daß der Gehalt an TSG101 in der Zelle konstant bleibt (Feng *et al.*, 2000). Diese Regulation wird von der sogenannten *Steadiness Box*, am C-terminalen Bereich des Proteins, vermittelt.

Anfängliche Studien an TSG101 deuteten auf eine Rolle als Transkriptionsfaktor: TSG101 zeigte eine inhibierende Wirkung auf die NR-vermittelte Transkription (Watanabe *et al.*, 1998; Hittelman *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999). Neuere Untersuchungen weisen jedoch auf eine Funktion in einer Reihe von Ubiquitin-vermittelten Prozessen, wie der Stabilisierung von Proteinen (MDM2 und p21) (Li *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2002), dem Aussortieren von Proteinen in den späten Endosomen (Babst *et al.*, 2000) und der Freisetzung von Viruspartikeln in den interzellulären Raum (Myers & Allen, 2002).

In dieser Arbeit wurde TSG101 als Interaktionspartner von AATF identifiziert. Die Isolierung der cDNA von TSG101 aus der Ratte zeigte ein offenes Leseraster, das für ein vorausgesagtes Protein von 391 AS kodiert, mit einer 93%-igen bzw. 97%-igen Identität zu TSG101 aus Mensch respektive Maus auf Proteinebene. Entsprechend sind alle strukturellen Eigenschaften, wie die Anwesenheit der Ubc-Domäne, des Leucin-Zippers, der CC2-Domäne, und der  $\alpha$ -helikalen, C-terminalen Region in der Rattensequenz vorhanden. Die Interaktion mit AATF wird von der C-terminalen Region vermittelt. Eine Immunfluoreszenzanalyse von TSG101 zeigte eine diffuse Verteilung des Proteins über die gesamte Zelle, mit einer deutlichen Anreicherung in den Endosomen. Die Koexpression mit AATF resultierte jedoch in einer partiellen Umverteilung von TSG101 in den Zellkern. Demzufolge wird TSG101 von AATF in den Zellkern rekrutiert, was die Interaktion der beiden Proteine *in vivo* bestätigt. Überraschenderweise zeigte TSG101 in dieser Arbeit eine aktivierende Wirkung auf die AR-vermittelte Transkription. Diese Aktivierung war unabhängig von den verwendeten Empfängerzellen und wurde sowohl für TSG101 aus der Ratte als für das humane Protein nachgewiesen. Die Gründe für die Abweichungen zwischen den veröffentlichten und unseren Daten sind unklar.

### **5.5.1. AATF als Koaktivator der AR-vermittelten Transkription**

Da AATF drei LXXLL-Motive besitzt, welche charakteristisch für Koaktivatoren der NR sind, wurde auch ein direkter Einfluß von AATF auf NR untersucht. Tatsächlich verstärkte AATF die ligandenabhängige Transaktivierung des AR. Die Expression von AATF resultierte in einer dosis-abhängigen, bis zu fünffachen Steigerung der Transkription. Demzufolge wurde AATF als spezifischer Koaktivator des AR identifiziert.

Im Rahmen seiner Diplomarbeit hat Peter Leister die aktivierende Wirkung von AATF näher analysiert. Er konnte zeigen, daß AATF auch eine Stimulierung der GR- und ER-vermittelten Transkription bewirkt und mit allen drei Rezeptoren eine direkte Interaktion eingeht (Leister *et al.*, 2003). Durch Mutation der LXXLL-Motive konnte außerdem gezeigt werden, daß die Motive am N- und C-terminalen Ende des Proteins (LX1 und LX3 in Abbildung 1 der Einleitung) die Interaktion und damit die verstärkende Wirkung von AATF auf die untersuchten Steroidhormonrezeptoren vermitteln. Die Zerstörung des zentralen LXXLL-

Motivs im Leucin-Zipper (LX2 in Abbildung 1) hatte keinen Effekt. Ein Einfluß von AATF auf Nicht-Steroidhormonrezeptoren (Klasse II) wurde bisher nicht untersucht.

Nach der Identifizierung von AATF als spezifischem Koaktivator von Steroidhormonrezeptoren stellt sich die Frage, welche Mechanismen der aktivierenden Wirkung von AATF zugrunde liegen. AATF weist keinerlei Homologien mit Acetyltransferasen oder Methyltransferasen auf. An seinem N-Terminus enthält AATF jedoch einen extrem sauren Bereich, der in Hefe eine transaktivierende Wirkung zeigt (I. Lödige, Diplomarbeit 2000). Die Anwesenheit einer sauren Domäne ist eine Eigenschaft vieler Transkriptionsfaktoren, wie z.B. BRCA1, VP16 und Pho4. Bei diesen Transkriptionsfaktoren ist die saure Domäne an der Umstrukturierung des Chromatins beteiligt (Svaren *et al.*, 1994; Tumbar *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 1999). Für VP16 wurde gezeigt, daß die Bindung der sauren Transaktivierungsdomäne an die Promotorregion in einer Rekrutierung verschiedener Histonacetyltransferasen und einer gleichzeitigen Acetylierung der Histone resultiert. Möglicherweise hat die saure Domäne von AATF ähnliche Funktionen. In diesem Zusammenhang wurde eine funktionelle Kooperation von AATF mit der Histonacetyltransferase p300 bei der Stimulierung der AR-vermittelten Transkription beobachtet (Leister *et al.*, 2003). Ob die saure Domäne von AATF eine direkte Interaktion mit p300 eingehen kann, ist unklar. Da von TSG101 gezeigt wurde, daß es mit p300 interagiert (Sun *et al.*, 1999) und AATF und TSG101 bei der Transkriptionsaktivierung kooperieren, könnte auch TSG101 die Interaktion mit p300 vermitteln.

Ein weiterer Mechanismus der Aktivierung könnte in der Rekrutierung der Dlk bestehen. Diese Kinase bewirkt die Phosphorylierung von Histonproteinen, insbesondere Histon-H3 (Preuss *et al.*, 2003). Die Rekrutierung von Dlk durch AATF könnte zur Phosphorylierung von Histon-H3 im Promotorbereich und somit ebenfalls zur Auflockerung der Chromatinstruktur beitragen. Tatsächlich wurde gezeigt, daß eine Aktivierung der Transkription sowohl durch eine Histonacetylierung als auch durch eine Histonphosphorylierung unterstützt werden kann (Lefebvre *et al.*, 2002).

Eine weitere Möglichkeit, wie AATF die NR-vermittelte Transaktivierung stimulieren könnte, ist durch die Verdrängung von Korepressoren, wie z.B. Histondeacetylasen. Im Rb/E2F-System wurde für AATF ein solcher Effekt festgestellt (Bruno *et al.*, 2002). Rb ist ein

Tumorsuppressor, der an den Transkriptionsfaktor E2F binden kann und dessen Aktivität unterdrückt (Ferreira *et al.*, 2001). Zusätzlich fungiert Rb durch die Rekrutierung der Histondeacetylase HDAC1 als aktiver Repressor. AATF konkurriert mit HDAC1 um die gleiche Bindungsstelle von Rb und verdrängt HDAC1 von dem Rb/E2F-Komplex. Dadurch stimuliert AATF die Transkription der E2F-Zielgene (Bruno *et al.*, 2002).

Die Aktivität von NR wird, abgesehen von dem Einfluß der Koaktivatoren, auch durch verschiedene Korepressoren, wie z.B. Histondeacetylasen, reguliert. Dies gilt insbesondere für die Nicht-Steroidhormonrezeptoren, die auch in Abwesenheit des entsprechenden Hormons an der DNA gebunden sind, und durch die Rekrutierung von Korepressoren die Transkription verhindern (Übersicht bei McKenna & O'Malley, 2002). Für Steroidhormonrezeptoren wurde jedoch ebenfalls eine negative Regulierung durch Histondeacetylasen festgestellt (Liao *et al.*, 2002). Es wäre denkbar, daß AATF auch hier, wie in dem Rb/E2F-System, eine Verdrängung der Histondeacetylasen bewirken kann.

Schließlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß AATF die NR-vermittelte Transkription auch durch die Rekrutierung von TSG101, stimulieren kann.

### **5.5.2. TSG101 steigert die transaktivierende Wirkung des AR durch die Stimulierung dessen Monoubiquitinierung**

Als nächstes stellt sich die Frage nach der Rolle von TSG101 in der AR-vermittelten Transkription. Der Einsatz von Deletionsmutanten zeigte, daß sowohl die Interaktionsdomäne für AATF als auch die Ubc-Region wichtig sind für die Funktion als Koaktivator. Die Notwendigkeit der Ubc-Region ließ einen Zusammenhang zwischen Transaktivierung und Ubiquitinierung vermuten. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß die AR-vermittelte Transkription durch die Monoubiquitinierung des Rezeptors aktiviert wird und daß TSG101 eine Anreicherung an monoubiquitiniertem Rezeptor bewirkt. Um dies zu erzielen, kamen zwei mögliche Mechanismen in Frage: entweder durch Stimulation der Monoubiquitinierung oder durch die Verhinderung der Polyubiquitinierung. Der Einsatz einer Ubiquitin-Mutante, welche die Polyubiquitinierung der Zielproteine verhindert, zeigte, daß Letzteres zutreffend ist.

Bisher wurde ein Zusammenhang zwischen der Ubiquitinierung von NR und deren transaktivierenden Wirkung nur indirekt nachgewiesen. So wurde gezeigt, daß die transaktivierende Wirkung der NR eng verknüpft ist mit deren Degradierung. So führte die Inhibition des Ubiquitin-vermittelten Abbaus in den Proteasomen zu einem Verlust der transaktivierenden Wirkung des AR, GR und ER (Lonard *et al.*, 2000; Wallace & Cidlowski, 2001; Kang *et al.*, 2002). Umgekehrt führte auch die Unterdrückung der Transkription zu einem beeinträchtigten Abbau des Rezeptors (Reid *et al.*, 2003). Beide Prozesse scheinen also gegenseitig von einander abhängig zu sein.

Nach heutigem Verständnis ist die NR-vermittelte Transkription ein zyklischer Prozeß, in dem der Rezeptor mit Hilfe der Koaktivatoren die Transkription der Zielgene induziert, anschließend durch den Ubiquitin-vermittelten Abbau degradiert wird und somit den Platz freimacht für einen nächsten Zyklus der Transaktivierung (Kang *et al.*, 2002; Reid *et al.*, 2003). Die Unterdrückung der Ubiquitin-vermittelten Degradierung verhindert demzufolge die Freisetzung des Promotors für den nächsten Zyklus, und unterbindet somit eine einwandfreie Fortsetzung der Transkription (Shang *et al.*, 2000).

In diesem Zusammenhang wurde postuliert, daß die Kopplung der Transkription an den Ubiquitin-vermittelten Abbau der Transkriptionsfaktoren ein Mechanismus für die Begrenzung der Transkription sein könnte, der dafür zuständig ist, daß die Transkription beendet werden kann, wenn sie nicht mehr erwünscht ist, d.h. in Abwesenheit von Hormon (Thomas & Tyers, 2000; Tansey, 2001).

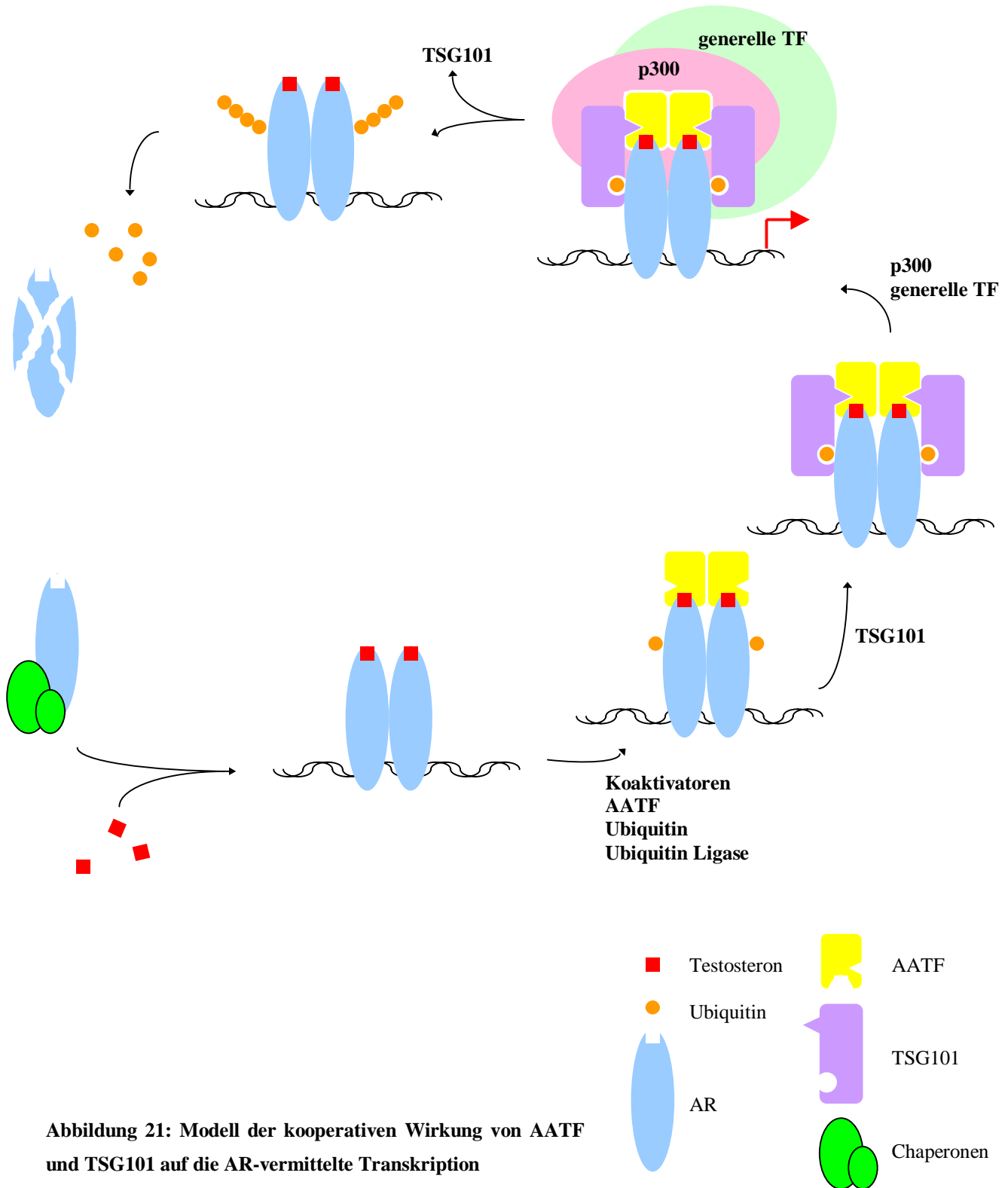
Bisher war nicht klar, ob die Ubiquitinierung noch während der Initiation oder unmittelbar nach dem Übergang zur Elongation erfolgt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten an, daß die Monoubiquitinierung des Rezeptors einen aktiven Zustand repräsentiert, und demzufolge die Kopplung der ersten Ubiquitineinheit vor oder während der Initiation stattfinden sollte.

Bei der Regulierung dieser Ubiquitinierungsvorgänge spielt die Ubc-Region von TSG101 eine entscheidende Rolle. Obwohl diese Region durch eine Mutation in ihrem aktiven Zentrum keine kovalente Bindung mehr mit Ubiquitin eingehen kann, zeigt sie eine Affinität für Ubiquitin (Bishop *et al.*, 2002). Deswegen liegt die Vermutung nahe, daß die Ubc-Region an die Ubiquitineinheit von monoubiquitinierten Zielproteinen bindet, sie quasi wie ein Schutzschild abschirmt vor der Kopplung von weiteren Ubiquitineinheiten und somit die Polyubiquitinierung des Zielproteins verhindert.

Wie beeinflusst nun AATF die Wirkung von TSG101 auf die AR-vermittelt Transaktivierung? In den Transaktivierungsversuchen wurde ermittelt, daß AATF und TSG101 eine kooperative Wirkung auf die Transaktivierung haben. Des weiteren wurde gezeigt, daß die C-terminale  $\alpha$ -helikale Region von TSG101, die für die Interaktion mit AATF zuständig ist, für eine effiziente Aktivierung unabdingbar ist. Dies läßt sich so interpretieren, daß TSG101 von AATF rekrutiert wird. Diese Annahme wird weiter unterstützt durch die Beobachtung, daß die Expression von AATF eine Anreicherung von TSG101 in den Zellkern verursacht und somit eine effizientere Interaktion mit den AR ermöglicht.

Eine direkte Interaktion von TSG101 mit NR wurde bisher nur in Hefen festgestellt (Hittelman *et al.*, 1999). Möglicherweise wird die *in vivo* Interaktion der beiden Proteine von AATF stabilisiert.

Aufgrund von Befunden aus der Literatur und den in dieser Arbeit erhaltenen Daten wird folgendes Modell zur Aktivierung der NR-vermittelten Transkription vorgeschlagen (Abbildung 21). In Abwesenheit von Testosteron liegt der inaktive AR an Chaperone wie HSP90 und HSP70 gekoppelt im Zytoplasma vor. Nach der Induktion mit Testosteron verliert der AR die Affinität für die Chaperone und migriert in den Zellkern, wo er an Promotor- bzw. Enhancerregionen der Zielgene bindet und Koaktivatoren wie p160, CBP/300 und AATF rekrutiert. AATF rekrutiert wiederum TSG101 und stabilisiert die Interaktion von TSG101 mit dem AR. Durch die Ubiquitinligaseaktivität verschiedener Koaktivatoren, wie z.B. E6-AP oder p300 (Nawaz *et al.*, 1999; Grossman *et al.*, 2003), wird der Rezeptor zunächst monoubiquitiniert. Anschließend legt sich TSG101 mit seiner Ubc-Region über diese Ubiquitineinheit und schützt den AR vor Polyubiquitinierung. Somit hält TSG101 die aktive, monoubiquitinierte Form des AR in Stand bis die Transkription erfolgt ist. Nach der Initiierung der Transkription muß die schützende Wirkung von TSG101 aufgehoben werden. Dies geschieht vermutlich durch eine Konformationsänderung, welche von posttranslationalen Modifikationen oder durch Interaktion mit zusätzlichen Proteinen induziert werden könnte. Dadurch wird die Ubiquitineinheit wieder zugänglich und es können die Polyubiquitinierung und der Abbau des AR in den Proteasomen stattfinden. Dadurch wird die Promotorregion wieder freigemacht für einen nächsten Transkriptionszyklus (Reid *et al.*, 2003).



**Abbildung 21: Modell der kooperativen Wirkung von AATF und TSG101 auf die AR-vermittelte Transkription**

Nach der Induktion mit Testosteron migriert der AR in den Zellkern, wo er an die Promotor- und Enhancersequenzen der Zielgene bindet und eine Reihe von Koaktivatoren, wie z.B. p160, p300 und AATF rekrutiert. AATF rekrutiert wiederum TSG101 in den Zellkern. TSG101 bindet den monoubiquitinierten Rezeptor und verhindert dessen Polyubiquitinierung, bis die Transkription angefangen hat. Anschließend wird die von TSG101 vermittelte Abschirmung der Ubiquitineinheit aufgehoben und der Rezeptor wird nach der Kopplung zusätzlicher Ubiquitineinheiten in den Proteasomen abgebaut.



Dieses Modell trägt zu einem neuen Verständnis der Zusammenhänge zwischen der Ubiquitinierung und der Transkription bei. Dabei wurde nachgewiesen, daß die Transkription mit der Monoubiquitinierung des Rezeptors korreliert. Des weiteren wurde mit TSG101 ein Protein identifiziert, das den Schutz dieser Monoubiquitineinheit gewährleistet und somit eine effiziente Transkription ermöglicht. Dabei wurde die Rolle von TSG101 als Regulator von Ubiquitin-abhängigen Prozessen im Zytoplasma auf Vorgänge im Zellkern, nämlich die Regulierung der Transkription, ausgeweitet. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob die Aktivierung durch Monoubiquitinierung ein Mechanismus ist, der sich auf Nuklearrezeptoren beschränkt oder ein generelles Prinzip zur Initiierung der Transkription ist.

### **5.5.3. Physiologische Bedeutung der aktivierenden Wirkung von AATF und TSG101 auf die AR-vermittelte Transkription**

Abschließend kann man sich die Frage nach der Physiologischen Bedeutung des Einflusses von AATF und TSG101 auf die AR-vermittelte Transkription stellen. Für den AR wurden mehrere wichtige Funktionen bei der Entwicklung des Organismus festgestellt. So spielt der AR eine Rolle bei der Differenzierung der Geschlechtsorgane während der Embryogenese, bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der Spermatogenese und bei der Wachstumskontrolle der männlichen Geschlechtsorgane sowie der Prostata. Der AR kann je nach Gewebe eine Inhibition oder eine Stimulierung der Zellteilung bewirken. Während Testosteron bei der Differenzierung der männlichen Geschlechtsorgane die Zellteilung unterdrückt, wird z.B. in der Prostata durch eine Stimulierung des AR eine Proliferation der Zellen beobachtet. Des weiteren wirkt der AR in diesen Geweben als Überlebensfaktor und unterdrückt die Apoptose.

AATF und TSG101 haben ebenfalls eine Funktion bei der Regulierung des Zellzyklus. Beide Proteine Stimulieren eine Proliferation der Zellen (Bruno *et al.*, 2002; Krempler *et al.*, 2002), und werden bei der Differenzierung herunterreguliert (Lindfors *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2002). Für TSG101 wurde sogar gezeigt, daß dessen Expression die Differenzierung unterdrücken kann (Oh *et al.*, 2002). Demzufolge ist eine gegenseitige Beeinflussung von AATF, TSG101

und AR bei der Wachstumskontrolle und bei Differenzierungsprozessen möglich. Bei der Proliferierung von Prostatazellen ist die transaktivierende Wirkung des AR für den G1/S-Übergang erforderlich (Cifuentes *et al.*, 2003). AATF spielt ebenfalls eine Rolle bei der Restriktionspunktkontrolle. AATF unterdrückt nämlich die inhibierende Wirkung von Rb auf den Transkriptionsfaktor E2F durch die Verdrängung der Histondeacetylase HDAC1 und induziert so den Übergang von der G1- in die S-Phase (Bruno *et al.*, 2002). TSG101 spielt eine indirekte Rolle bei der Zellzykluskontrolle. Die Inaktivierung von TSG101 führte zum Anstieg von p53, der Induktion von p21 und damit zu einer Arretierung des Zellzyklus beim G1/S-Übergang (Zhong *et al.*, 1998; Ruland *et al.*, 2001; Krempler *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2002).

Sowohl der AR, als auch AATF und TSG101 haben also eine individuelle Funktion beim G1/S-Übergang. Zusätzlich wird in dieser Arbeit eine Kooperation der drei Proteine aufgezeigt. Eine mögliche Zusammenarbeit der Proteine könnte so aussehen, daß der AR die Transkription von Genen, die für den G1/S-Übergang notwendig sind, induziert und dabei von AATF und TSG101 unterstützt wird.

Der intrazelluläre Gehalt an TSG101 bleibt während dem Zellzyklus konstant. Die Konzentration an AATF steigt jedoch beim G1/S-Übergang (Bruno *et al.*, 2002). AATF könnte demzufolge eine Zellzyklus-abhängige Rekrutierung von TSG101 in den Zellkern vermitteln.

Ferner wurde gezeigt, daß der AR die Apoptose unterdrücken kann (Colombel *et al.*, 1995). Die Mechanismen wie der AR den gezielten Zelltod verhindert sind jedoch unbekannt. Da auch für AATF ein inhibierender Effekt auf die Apoptose nachgewiesen wurde (Page *et al.*, 1999), ist eine Zusammenarbeit der beiden Proteine auch in diesem Zusammenhang denkbar.

Die Generierung einer Knockout-Mutante von AATF in Mäusen erwies sich als embryonal letal am Tag E 3,5 (Thomas *et al.*, 2000). Die Inaktivierung des AR ist für die Entwicklung des Embryos nicht lebensbedrohlich, verursacht aber bei den männlichen Nachkommen eine fehlerhafte Entwicklung der Geschlechtsorgane. Auch die Inaktivierung der anderen Steroidhormonrezeptoren bewirkt kein Absterben des sich entwickelnden Embryos.

Dies bedeutet, daß die Ursachen für das Absterben des Embryos in den AATF-Knockout-Mutanten nicht auf eine fehlerhafte Aktivierung der Steroidhormonrezeptoren zurückzuführen ist, sondern auf eine Steroidhormonrezeptor-unabhängige Funktion von AATF beruht.

### **5.5.4. Mögliche biologische Funktion von AATF**

Der Phänotyp von AATF-Knockout-Mäusen deutet auf eine wichtige Rolle des Proteins sehr früh in der Embryogenese (Thomas *et al.*, 2000). In diesem Stadium wird die bis dahin sehr kompakte Chromatinstruktur geöffnet und der Embryo entwickelt eine eigene Transkriptionssteuerung. AATF könnte in diesem Entwicklungsstadium eine entscheidende Rolle spielen bei der generellen Auflockerung der Chromatinstruktur und somit bei dem Einrichten einer selbstständigen Transkriptionsregulierung. Dies würde erklären, daß die Inaktivierung von AATF zu gravierenden Fehlfunktionen führt und dabei sehr unterschiedliche Prozesse, wie u.a. die Bildung der Ribosomen, die Gestaltung eines Aktinskeletts und die Proliferation der Zellen stark beeinträchtigt.

In einem späteren Stadium könnte AATF eine Rolle als Zellzyklusregulator übernehmen. Diese Funktion wird vermutlich durch eine Aktivität als Mediator der Transkription vermittelt. AATF scheint verschiedene Komponenten, die für eine effiziente Transkription verschiedener Zielgene benötigt werden, zusammenzubringen. Eine Rolle von AATF als Mediator der Transkription würde bedeuten, daß AATF mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren kooperiert und so zur Expression verschiedener Gene beiträgt. Bisher wurde jedoch ausschließlich ein aktivierender Effekt auf Steroidhormonrezeptoren und auf Rb/E2F nachgewiesen. Insbesondere die Interaktion mit Rb deutet auf eine Beteiligung an der Zellzykluskontrolle bei dem G1/S-Übergang, während die Kooperation mit Steroidhormonrezeptoren sehr verschiedener Prozessen, wie z.B. die Regulierung des Zellzyklus, die Differenzierung und die Apoptose, betreffen kann. Es bleibt abzuwarten, ob AATF in Abhängigkeit von den physiologischen Bedingungen, auch mit anderen Transkriptionsfaktoren kooperieren kann.

Schließlich ist es denkbar, daß AATF, abgesehen von einer Funktion bei der Transkription, an anderen Prozessen beteiligt ist. So könnte die Interaktion von AATF mit AIP1 auf eine

mögliche Funktion von AATF bei intrazellulären Transportprozessen deuten. Diese Annahmen müssen jedoch von weiteren Untersuchungen bestätigt werden.

### **5.6. Ausblick**

Durch die in dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartner ergeben sich interessante Fragestellungen bezüglich der biologischen Rolle von AATF, zur Wirkungsweise von TSG101 und zur Aktivierung der NR. Die wichtigste Aufgabe wird darin liegen, die aktivierende Wirkung von AATF und TSG101 auf die NR-vermittelte Transkription weiter zu analysieren.

In dieser Arbeit wurden AATF und TSG101 als Koaktivatoren des AR identifiziert. Im Rahmen seiner Diplomarbeit konnte Peter Leister zeigen, daß AATF auch die GR- und ER-vermittelte Transkription aktiviert. Diese Befunde basieren jedoch auf Transaktivierungsversuchen mit Luciferasereportergenen, deren Expression entweder von einem künstlichen oder von einem viralen Promotor kontrolliert wurde. Obwohl Transaktivierungsexperimente mit Reporterkonstrukten bewährte Modellsysteme für die NR-vermittelte Transkription sind, sollte überprüft werden, ob AATF und TSG101 auch die Expression von endogenen Zielgenen aktivieren können. Hierzu könnte man mittels quantitativer RT-PCR die Expression von einigen NR-induzierbaren Genen analysieren und überprüfen, ob die ektopische Expression von AATF und/oder TSG101 eine Steigerung der Transkription bewirkt. Des weiteren sollte überprüft werden, ob AATF ein genereller Koaktivator von NR ist oder sich die Wirkung auf Steroidhormonrezeptoren beschränkt. Im Bezug auf Rezeptoren der Klasse II, die in Abwesenheit des entsprechenden Hormons als Repressor fungieren (siehe Einleitung), wäre es interessant zu untersuchen, ob AATF, wie im Rb/E2F-System, durch Verdrängung von Histondeacetylasen eine Aktivierung bewirken kann. Auch der Einfluß von TSG101, und die damit verbundene Regulierung der Ubiquitinierung auf die Nicht-Steroidhormon-abhängige Transkription sollte untersucht werden.

Ferner sollte man mittels Chromatin-Immunpräzipitations-Analyse untersuchen, ob man die Anwesenheit von AATF und TSG101 im Promotorkomplex von Zielgenen der NR

nachweisen kann. Dies würde auch Informationen über die Kinetik der Assoziation der verschiedenen Koaktivatoren mit dem AR sowie über mögliche sequentielle Veränderungen in der Zusammensetzung des Promotorkomplexes liefern.

Des weiteren sollte untersucht werden, ob die Assoziierung des AR mit AATF und TSG101 essentiell ist für eine effiziente Transaktivierung. Dazu könnte man das endogene AATF und/oder TSG101 mittels RNA-Interferenz herunterregulieren und in einem Transaktivierungsversuch der Frage nachgehen, ob die AR-vermittelte Transkription noch induziert werden kann. Die Inaktivierung von TSG101 könnte auch zeigen, ob der aktivierende Einfluß von AATF ausschließlich auf der Rekrutierung von TSG101 beruht oder ob AATF die NR-vermittelte Transkription auch auf anderem Wege stimuliert.

Nicht zu vergessen sind auch die anderen Interaktionspartner von AATF, die in dieser Arbeit identifiziert wurden. Um mehr Klarheit über die biologische Funktion von Mns1 zu bekommen, sollte man zunächst die punktförmige, intrazelluläre Verteilung weiter charakterisieren. Um herauszufinden, um welche Strukturen es sich hier handelt, müßte man eine eventuelle Kolo-kalisierung von Mns1 mit Markerproteinen, die eine spezifische Verteilung in der Zelle aufweisen, untersuchen.

Des weiteren könnte man nachgehen, ob AATF und Pmf-1 bei der Nrf-2-vermittelten Transkription kooperieren. Dies könnte man in einem Transaktivierungsversuch mit dem Luciferasegen unter Kontrolle des SSAT-Promotors überprüfen. Da die Expression des SSAT-Gens von Testosteron stimuliert wird (Bettuzzi *et al.*, 2001) und Polyamine die Interaktion von NR mit ihren Koaktivatoren beeinflussen können (Maeda *et al.*, 2002), sollte auch eine Kooperation von Pmf-1 mit dem AR und AATF untersucht werden.

Um die Interaktion von AATF mit AIP1 weiter zu charakterisieren, sollte man zunächst analysieren, ob AIP1 tatsächlich eine Rolle bei intrazellulären Transportprozessen spielt. Dazu könnte man die Effekte einer Inaktivierung des Proteins mittels RNA-Interferenz untersuchen. Des weiteren könnte man mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System oder mittels Affinitätschromatographie mögliche Interaktionspartner von AIP1 identifizieren. So könnte man feststellen, ob AIP1 eventuell mit Motorproteinen interagieren kann und welche Fracht

für den AIP1-vermittelten Transport in Frage kommt. Anschließend könnte man eine Beteiligung von AATF untersuchen. Bevor man jedoch eine klare Aussage über eine mögliche Funktion von AATF im Zytoplasma machen kann, sollte man mit einem AATF-spezifischen Antikörper die intrazelluläre Verteilung des endogenen Proteins analysieren. Diese und weitere Experimente sollten dazu beitragen, mehr Klarheit über die biologische Funktion von AATF zu bekommen.

## 6. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor AATF (*Apoptosis Antagonizing Transcription Factor*) wurde als Interaktionspartner der Dlk/ZIP-Kinase und der RNA-Polymerase II identifiziert. Zudem interagiert AATF mit dem Retinoblastomprotein, bewirkt dadurch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F und ist somit an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt. In dieser Arbeit sollten mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System weitere Interaktionspartner von AATF identifiziert werden. Vier Klone, die für potentielle Interaktionspartner kodieren, wurden isoliert. Es handelte sich um Mns1 (*Meiosis-specific nuclear structural Protein 1*), Pmf-1 (*Polyamin-modulated factor-1*), TSG101 (*Tumor Susceptibility Gene 101*) und eine cDNA-Sequenz, die für ein noch nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein kodiert und AIP1 (*AATF Interacting Protein 1*) genannt wurde. Für AIP1 und TSG101 konnte die Interaktion mit AATF *in vitro* bestätigt werden, für Pmf-1 und Mns1 jedoch nicht.

Mns1 ist ein Mitglied der *Intermediate Filament* Proteine, dessen Expression auf die Spermatozyten beschränkt ist. Die Expression eines GFP-Fusionsprotein von Mns1 ergab eine Anfärbung von punktförmigen Strukturen im Zytoplasma, deren Identität jedoch nicht geklärt wurde. Die Koexpression von AATF und Mns1 führte zu einer partiellen Kolo-kalisierung von AATF mit Mns1 im Zytoplasma, was für die Interaktion der beiden Proteine *in vivo* spricht.

Pmf-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulierung des Polyaminstoffwechsels beteiligt ist. Die Expression von Pmf-1 in REF52.2-Zellen zeigte eine diffuse Verteilung des Proteins im Zytoplasma. Die Koexpression von Pmf-1 mit AATF hatte keinen Einfluß auf die subzelluläre Verteilung von Pmf-1 oder AATF, das nach wie vor im Zellkern vorlag, so daß offen bleibt, ob diese beiden Proteine tatsächlich miteinander interagieren.

Das bisher unbekannte AIP1 zählt 153 Aminosäuren und besitzt an seinem N-Terminus eine Region mit hoher Homologie zu der Myo4-Bindungsdomäne von She3p, einem Protein aus der Hefe, das am intrazellulären Transport von mRNA beteiligt ist. Eine Northern Blot Analyse ergab für AIP1 eine ubiquitäre Verteilung, mit einer starken Expression in Gehirn und Hoden. Eine Immunfluoreszenzanalyse zeigte eine diffuse zytoplasmatische Verteilung von GFP-AIP1. Die Expression von AIP verursachte eine partielle Umverteilung von AATF aus dem Zellkern ins Zytoplasma.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Interaktion von AATF mit TSG101. Die ektopische Expression von TSG101 ergab eine diffuse Verteilung des Proteins über die

gesamte Zelle, mit einer deutlichen Anreicherung in den Endosomen. Eine Koexpression mit AATF zeigte jedoch eine partielle Umverteilung von TSG101 in den Zellkern.

Sowohl für AATF als auch für TSG101 wurde eine aktivierende Wirkung auf die Androgenrezeptor-vermittelte Transkription festgestellt. Da TSG101 eine Rolle bei verschiedenen Ubiquitin-abhängigen Prozessen spielt, wurde untersucht, ob auch die verstärkende Wirkung von TSG101 auf den Androgenrezeptor durch einen Einfluß auf die Ubiquitinierung zustande kommt. Dabei wurde gezeigt, daß 1. die Ubiquitinierung des Androgenrezeptors eine Stimulierung der Transkription bewirkt, 2. die Kopplung einer einzigen Ubiquitineinheit ausreichend ist für eine effiziente Aktivierung und 3. daß TSG101 durch die Unterdrückung der Polyubiquitinierung eine Anreicherung an monoubiquitiniertem Androgenrezeptor bewirkt. Man kann postulieren, daß dadurch die transkriptionell aktive Form des Androgenrezeptors geschützt und somit eine effiziente Transaktivierung ermöglicht wird. Diese Daten erweitern die Funktion von TSG101 als Regulator von Ubiquitin-abhängigen Prozessen auf den Vorgang der Transkription und stellen einen neuen Regelmechanismus für die Aktivierung des Androgenrezeptors dar.



## 7. Literaturverzeichnis

- AgoulNIK,I.U., Krause,W.C., Bingman,W.E., Rahman,H.T., Amrikachi,M., Ayala,G.E. und Weigel,N.L. (2003) Repressors of androgen and progesterone receptor action. *J Biol Chem*, in Druck.
- Alhonen,L., Karppinen,A., Uusi-Oukari,M., Vujcic,S., Korhonen,V.P., Halmekyto,M., Kramer,D.L., Hines,R., Janne,J. und Porter,C.W. (1998) Correlation of polyamine and growth responses to N1,N11-diethylnorspermine in primary fetal fibroblasts derived from transgenic mice overexpressing spermidine/spermine N1-acetyltransferase. *J Biol Chem* 273(4), 1964-1969.
- Aronov,S., Aranda,G., Behar,L. und Ginzburg,I. (2001) Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *J Neurosci* 21(17), 6577-6587.
- Babst,M., Odorizzi,G., Estepa,E.J. und Emr,S.D. (2000) Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic* 1, 248-258.
- Bannister,A.J. und Kouzarides,T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384(6610), 641-643.
- Beitel,L.K., Elhaji,Y.A., Lumbroso,R., Wing,S.S., Panet-Raymond,V., Gottlieb,B., Pinsky,L. und Trifiro,M.A. (2002) Cloning and characterization of an androgen receptor N-terminal-interacting protein with ubiquitin-protein ligase activity. *J Mol Endocrinol* 29(1), 41-60.
- Berry,M., Metzger,D. und Chambon,P. (1990) Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J* 9(9), 2811-2818.
- Bettuzzi,S., Strocchi,P., Davalli,P., Marinelli,M., Furci,L. und Corti,A. (2001) Androgen responsiveness and intrarenal localization of transcripts coding for the enzymes of polyamine metabolism in the mouse. *Biochem Cell Biol* 79(2), 133-140.
- Birnboim,H.C. und Doly,J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res* 7(6), 1513-1523.
- Bishop,N., Horman,A. und Woodman,P. (2002) Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J Cell Biol* 157(1), 91-101.
- Bobola,N., Jansen,R.P., Shin,T.H. und Nasmyth,K. (1996) Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* 84(5), 699-709.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Boehrer,S., Chow,K.U., Beske,F., Kukoc-Zivojnov,N., Puccetti,E., Ruthardt,M., Baum,C., Rangnekar,V.M., Hoelzer,D., Mitrou,P.S. und Weidmann,E. (2002) In lymphatic cells par-4 sensitizes to apoptosis by down-regulating bcl-2 and promoting disruption of mitochondrial membrane potential and caspase activation. *Cancer Res* 62(6), 1768-1775.
- Böhl,F., Kruse,C., Frank,A., Ferring,D. und Jansen,R.P. (2000) She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *EMBO J* 19(20), 5514-5524.
- Brandner,G. und Cho,M.S. (1977) African green monkey fibroblast actin morphology during SV40 infection. *Z Naturforsch* 32(5-6), 409-412.
- Bruno,T., De Angelis,R., De Nicola,F., Barbato,C., Di Padova,M., Corbi,N., Libri,V., Benassi,B., Mattei,E., Chersi,A., Soddu,S., Florodi,A., Passananti, C. und Fanciulli,M. (2002) Che-1 affects cell growth by interfering with the recruitment of HDAC1 by Rb. *Cancer Cell* 2, 387-399.
- Chemes,H.E., Fawcett,D.W. und Dym,M. (1978) Unusual features of the nuclear envelope in human spermatogenic cells. *Anat Rec* 192(4), 493-512.
- Chen,H., Lin,R.J., Schiltz,R.L., Chakravarti,D., Nash,A., Nagy,L., Privalsky,M.L., Nakatani,Y. und Evans,R.M. (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90(3), 569-580.
- Chiba,N., Suldan,Z., Freedman,L.P. und Parvin,J.D. (2000) Binding of liganded vitamin D receptor to the vitamin D receptor interacting protein coactivator complex induces interaction with RNA polymerase II holoenzyme. *J Biol Chem* 275(15), 10719-10722.
- Cifuentes,E., Croxen,R., Menon,M., Barrack,E.R. und Reddy,G.p. (2003) Synchronized prostate cancer cells for studying androgen regulated events in cell cycle progression from G1 into S phase. *J Cell Physiol* 195(3), 337-345.
- Colombel,M., Radvanyi,F., Blanche,M., Abbou,C., Buttyan,R., Donehower,L.A., Chopin,D. und Thiery,J.P. (1995) Androgen suppressed apoptosis is modified in p53 deficient mice. *Oncogene* 10(7), 1269-1274.
- Darimont,B.D., Wagner,R.L., Apriletti,J.W., Stallcup,M.R., Kushner,P.J., Baxter,J.D., Fletterick,R.J. und Yamamoto,K.R. (1998) Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev* 12(21), 3343-3356.

## 7. Literaturverzeichnis

---

Deslypere, J.P., Young, M., Wilson, J.D. und McPhaul, M.J. (1992) Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol Cell Endocrinol* 88, 15-22.

Dilworth, F.J. und Chambon, P. (2001) Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* 20, 3047-3054.

Doisneau-Sixou, S.F., Sergio, C.M., Carroll, J.S., Hui, R., Musgrove, E.A. und Sutherland, R.L. (2003) International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer: Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 10(2), 179-186.

Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J. und Reed, S.I. (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76(6), 1013-1023.

Dupré, S., Volland, C. und Haguénauer-Tsapis, R. (2001) Membrane transport: ubiquitylation in endosomal sorting. *Curr Biol* 11, 932-934.

Fanciulli, M., Bruno, T., Di Padova, M., De Angelis, R., Iezzi, S., Iacobini, C., Floridi, A. und Passananti, C. (2000) Identification of a novel partner of RNA polymerase II subunit 11, Che-1, which interacts and affects the growth suppression function of Rb. *FASEB J* 14, 904-912.

Feng, G.H., Lih, C.-J. und Cohen, S.N. (2000) TSG101 protein steady-state level is regulated posttranslationally by an evolutionarily conserved COOH-terminal sequence. *Cancer Res* 60, 1736-1741.

Ferreira, R., Naguibneva, I., Mathieu, M., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Pritchard, L.L. und Harel-Bellan, A. (2001) Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Rep* 2(9), 794-799.

Freedman, D.A. und Levine, A.J. (1999) Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein. *Cancer Res* 59(1), 1-7.

Frostesjö, L., Holm, I., Grahn, B., Page, A.W., Bestor, T.H. und Heby, O. (1997) Interference with DNA methyltransferase activity and genome methylation during F9 teratocarcinoma stem cell differentiation induced by polyamine depletion. *J Biol Chem* 272(7), 4359-4366.

Furukawa, K., Inagaki, H., Naruge, T., Tabata, S., Tomida, T., Yamaguchi, A., Yoshikuni, M., Nagahama, Y. und Hotta, Y. (1994) cDNA cloning and functional characterisation of a meiosis-specific protein (MNS1) with apparent nuclear association. *Chrom Res* 2, 99-113.

## 7. Literaturverzeichnis

---

Garrus,J.E., von Schwedler,U.K., Pornillos,O.W., Morham,S.G., Zavitz,K.H., Wang,H.E., Wettstein,D.A., Stray,K.M., Cote,M., Rich,R.L., Myszka,D.G. und Sundquist,W.I. (2001) Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55-65.

Gayther,S.A., Barski,P., Batley,S.J., Li,L., de Foy,K.A., Cohen,S.N., Ponder,B.A. und Caldas,C. (1997) Aberrant splicing of the TSG101 and FHIT genes occurs frequently in multiple malignancies and in normal tissues and mimics alterations previously described in tumours. *Oncogene* 15(17), 2119-2126.

Gerace,L. und Blobel,G. (1980) The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19(1), 277-287.

Gershman,H. und Rosen,J.J. (1978) Cell adhesion and cell surface topography in aggregates of 3T3 and SV40-virus-transformed 3T3 cells. Visualization of interior cells by scanning electron microscopy. *J Cell Biol* 76(3), 639-651.

Gianni ,M., Bauer,A., Garattini,E., Chambon,P. und Rochette-Egly,C. (2002) Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation. *EMBO J* 21(14), 3760-3769.

Giguere,V. (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocrine rev* 20(5), 689-725.

Glass,C.K. (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15(3), 391-407.

Gottlinger,H.G., Dorfman,T., Sodroski,J.G. und Haseltine,W.A. (1991) Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(8), 3195-3199.

Griffiths,G., Hoflack,B., Simons,K., Mellman,I. und Kornfeld,S. (1988) The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* 52(3), 329-341.

Grossman,S.R., Deato,M.E., Brignone,C., Chan,H.M., Kung,A.L., Tagami,H., Nakatani,Y. und Livingston,D.M. (2003) Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 300(5617), 342-344.

Haarer,B.K., Petzold,A., Lillie,S.H. und Brown,S.S. (1994) Identification of MYO4, a second class V myosin gene in yeast. *J Cell Sci* 107, 1055-1064.

Hanahan,D. (1983) Studies on transformation of Escherechia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166(4), 557-580.

Harbour,J.W. und Dean,D.C. (2000) Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 65-67.

- Heery,D.M., Kalkhoven,E., Hoare, S. und Parker,M.G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736.
- Heery,D.M., Hoare,S., Hussain,S., Parker,M.G. und Sheppard,H. (2001) Core LXXLL motif sequences in CREB-binding protein, SRC1, and RIP140 define affinity and selectivity for steroid and retinoid receptors. *J Biol Chem* 276(9), 6695-6702.
- Herold,G., Besemer,F., Rogler,D., Rogler,G. und Stange,E.F. (1993) Poyamine deficiency impairs proliferation and differentiation of cultured enterocytes (CaCo-2). *Z Gastroenterol* 31(2), 120-128.
- Hicke,L. (2001) A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106, 527-530.
- Hirschhorn,J.N., Brown,S.A., Clark,C.D. und Winston,F. (1992) Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev* 6, 2288-2298.
- Hittelman,A.B., Burakov,D., Iniguez-Lluhi,J.A., Freedman,L.P. und Garabedian,M.J. (1999) Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J* 18(19), 5380-5388.
- Hochstrasser,M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30, 405-439.
- Hu,Y.F., Hao,Z.L. und Li,R. (1999) Chromatin remodeling and activation of chromosomal DNA replication by an acidic transcriptional activation domain from BRCA1. *Genes Dev* 13(6), 637-642.
- Kang,Z., Pirskanen,A., Jänne,O.A. und Palvimo,J.J. (2002) Involvement of proteasome in the dynamic assembly of the androgen receptor transcription complex. *J Biol Chem* 277(50), 48366-48371.
- Katzmann,D.J., Babst,M. und Emr,S.D. (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145-155.
- Kiebler,M.A. und Desgroseillers,L. (2000) Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* 25(1), 19-28.
- Klawitz,I., Preuss,U. und Scheidtmann,K.H. (2001) Interaction of SV40 large T antigen with components of the nucleo/cytoskeleton. *Int J Oncol* 19(6), 1325-1332.
- Kloc,M., Zearfoss,N.R. und Etkin,L.D. (2002) Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell* 108, 533-544.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Kögel,D., Bierbaum,H., Preuss,U. und Scheidtmann,K.H. (1999) C-terminal truncation of Dlk/ZIP kinase leads to abrogation of nuclear transport and high apoptotic activity. *Oncogene* 18(51), 7212-7218.
- Kögel,D., Prehn,J.H. und Scheidtmann,K.H. (2001) The DAP kinase family of pro-apoptotic proteins: novel players in the apoptotic game. *Bioessays* 23, 352-358.
- Koonin,E.V. und Abagyan,R.A. (1997) TSG101 may be the prototype of a class of dominant negative ubiquitin regulators. *Nature Gen* 16, 330-331.
- Kouzarides,T. (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 12(2), 198-209.
- Krempler,A., Henry,M., Triplett,A.A. und Wagner,K.-U. (2002) Targeted deletion of the TSG101 gene results in cell cycle arrest at G1/S and p53 independent cell death. *J Biol Chem* 277(45), 43216-43223.
- Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259), 680-685.
- Latham,K.E. (1999) Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos. *Int Rev Cytol* 193, 71-124.
- Lee,M.P. und Feinberg,A.P. (1997) Aberrant splicing but not mutations of TSG101 in human breast cancer. *Cancer Res* 57(15), 3131-3134.
- Lefebvre,B., Ozato,K. und Lefebvre,P. (2002) Phosphorylation of histone H3 is functionally linked to retinoic acid receptor beta promoter activation. *EMBO Rep.* 3(4), 335-340.
- Leister,P., Burgdorf,S. und Scheidtmann,K.H. (2003) Apoptosis antagonizing transcription factor AATF is a novel coactivator of nuclear hormone receptors. *Signal Transduction*, in Druck.
- Li,L. und Cohen,S.N. (1996) tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells. *Cell* 85, 319-329.
- Li,L., Li,X., Francke,U. und Cohen,S.N. (1997) The TSG101 tumor susceptibility gene is located in chromosome 11 band p15 and is mutated in human breast cancer. *Cell* 88, 143-154.
- Li,L., Liao,J., Ruland,J., Mak,T.W. und Cohen,S.C. (2001) A TSG101/MDM2 regulatory loop modulates MDM2 degradation and MDM2/p53 feedback control. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(4), 1619-1624.
- Liao,G., Chen,L.Y., Zhang,A., Godavarthy,A., Xia,F., Ghosh,J.C., Li,H. und Chen,J.D. (2002) Regulation of androgen receptor activity by the nuclear receptor corepressor SMRT. *J Biol Chem* 277(7), 5052-5061.

- Lin,H.K., Altuwaijri,S., Lin,W.J., Kan,P.Y., Collins,L.L. und Chang,C. (2002) Proteasome activity is required for androgen receptor transcriptional activity via regulation of androgen receptor nuclear translocation and interaction with coregulators in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277(39), 36570-36576.
- Lindfors,K., Halttunen,T., Huotari,P., Nupponen,N., Vihinen,M., Visakorpi,T., Maki,M. und Kainulainen,H. (2000) Identification of a novel transcription factor-like gene from human intestinal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 660-666.
- Lipshitz,H.D. und Smibert,C.A. (2000) Mechanisms of RNA localization and translational regulation. *Curr Opin Genet Dev* 10(5), 476-488.
- Liu,R.T., Huang,C.C., You,H.L., Chou,F.F., Hu,C.C., Chao,F.P., Chen,C.M. und Cheng,J.T. (2002) Overexpression of tumor susceptibility gene TSG101 in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 21, 4830-4837.
- Lonard,D.M., Nawaz,Z., Smith,C.L. und O'Malley,B.W. (2000) The 26S proteasome is required for estrogen receptor- $\alpha$  and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor- $\alpha$  transactivation. *Mol Cell* 5(6), 939-948.
- Long,R.M., Singer,R.H., Meng,X., Gonzalez,I., Nasmyth,K. und Jansen,R.P. (1997) Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* 277(5324), 383-387.
- Long,R.M., Gu,W., Lorimer,E., Singer,R.H. und Chartrand,P. (2000) She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *EMBO J* 19(23), 6592-6601.
- Loy,C.J., Sim,K.S. und Yong,E.L. (2003) Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(8), 4562-4567.
- Maeda,Y., Rachez,C., Hawel,L., Byus,C.V., Freedman,L.P. und Sladek,F.M. (2002) Polyamines modulate the interaction between nuclear receptors and vitamin D receptor-interacting protein 205. *Mol Endocrinol* 16(7), 1502-1510.
- Martin-Serrano,J., Zang,T. und Bieniasz,P.D. (2001) HIV-1 and ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nature Med* 7(12), 1313-1319.
- Maucurer,A., Camonis,J.H. und Sobel, A. (1995) Stathmin interaction with a putative kinase and coiled-coil-forming protein domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3100-3104.

- Maxon,M.E. und Herskowitz,I. (2001) Ash1p is a site-specific DNA-binding protein that actively represses transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(4), 1495-1500.
- McKenna,N. und O'Malley,B.W. (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108, 465-474.
- Mellgren,G., Borud,B., Hoang,T., Yri,O.E., Fladeby,C., Lien,E.A. und Lund,J. (2003) Characterization of receptor-interacting protein RIP140 in the regulation of SF-1 responsive target genes. *Mol Cell Endocrinol* 203, 91-103.
- Mitchell,P.J. und Tjian,R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245(4916), 371-378.
- Molinari,E., Gilman,M. und Natesan,S. (1999) Proteasome-mediated degradation of transcriptional activators correlates with activation domain potency in vivo. *EMBO J* 18(22), 6439-6447.
- Münchow,S., Sauter,C. und Jansen, R.P. (1999) Association of the class V myosin Myo4p with a localised messenger RNA in budding yeast depends on She proteins. *J Cell Science* 112, 1511-1518.
- Mulholland,D.J., Cheng,H., Reid,K., Rennie,P.S. und Nelson C.C. (2002) The Androgen receptor can promote beta-catenin nuclear translocation independently of adenomatous polyposis coli. *J Biol Chem* 277(20), 17933-17943.
- Myers,E.L. und Allen,J.F. (2002) Tsg101, an inactive homologue of ubiquitin ligase E2, interacts specifically with human immunodeficiency virus type 2 Gag polyprotein and results in increased levels of ubiquitinated Gag. *J Virol* 76(22), 11226-11235.
- Nagy,L., Kao,H.Y., Chakravarti,D., Lin,R.J., Hassig,C.A., Ayer,D.E., Schreiber,S.L. und Evans,R.M. (1997) Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89(3), 373-380.
- Nakajima,T., Uchida,C., Anderson,S.F., Lee,C.G., Hurwitz,J., Parvin,J.D. und Montminy,M. (1997) RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* 90(6), 1107-1112.
- Nawaz,Z., Lonard,D.M., Smith,C.L., Lev-Lehman,E., Tsai,S.Y., Tsai,M.-J. und O'Malley,B.W. (1999) The angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* 19(2), 1182-1189.



## 7. Literaturverzeichnis

---

- Oh, Y., Proctor, M.L., Fan, Y.H., Su, L.K., Hong, W.K., Fong, K.M., Sekido, Y.S., Gazdar, A.F., Minna, J.D. und Mao, L. (1998) TSG101 is not mutated in lung cancer but a shortened transcript is frequently expressed in small cell lung cancer. *Oncogene* 17(9), 1141-1148.
- Oh, H., Mammucari, C., Nenci, A., Cabodi, S., Cohen, S.N. und Dotto, G.P. (2002) Negative regulation of cell growth and differentiation by TSG101 through association with p21<sup>Cip1/WAF1</sup>. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(8), 5430-5435.
- Oredsson, S.M. (2003) Polyamine dependence of normal cell-cycle progression. *Biochem Soc Trans* 31(2), 366-370.
- Otten, A.D., Sanders, M.M. und McKnight, G.S. (1988) The MMTV LTR promoter is induced by progesterone and dihydrotestosterone but not by estrogen. *Mol Endocrinol* 2(2), 143-147.
- Page, G., Lodige, I., Kogel, D. und Scheidtmann, K.H. (1999) AATF, a novel transcription factor that interacts with Dlk/ZIP kinase and interferes with apoptosis. *FEBS Lett* 462, 187-191.
- Pelkmans, L., Puntener, D. und Helenius, A. (2002) Local actin polymerisation and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 296(5567), 535-539.
- Pinkstaff, J.K., Chappell, S.A., Mauro, V.P., Edelman, G.M. und Krushel, L.A. (2001) Internal initiation of translation of five dendritically localized neuronal mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(5), 2770-2775.
- Ponting, C.P., Cai, Y.-D. und Bork, P. (1997) The breast cancer gene product TSG101: a regulator of ubiquitination? *J Mol Med* 75(7), 467-469.
- Porter, C.W., Ganis, B., Libby, P.R. und Bergeron, R.J. (1991) Correlations between polyamine analogue-induced increases in spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity, polyamine pool depletion, and growth inhibition in human melanoma cell lines. *Cancer Res* 51(14), 3715-3720.
- Pratt, W.B., Gehring, U. und Toft, D.O. (1996) Molecular chaperoning of steroid hormone receptors. *EXS* (77), 79-95.
- Preuss, U., Landsberg, G. und Scheidtmann, K.H. (2003) Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res* 31, 878-885.
- Quinlan, R., Hutchison, C. und Lane, B. (1995) Intermediate filament proteins. *Protein Profile* 2(8), 795-952.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Ray,R.M., Zimmerman,B.J., McCormack,S.A., Patel,T.B. und Johnson,L.R. (1999) Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21(Waf1/Cip1), p27(Kip1), and p53 in IEC-6 cells. *Am J Physiol* 276, 684-691.
- Refolo,L.M., Sambamurti,K., Efthimiopoulos,S., Pappolla,M.A. und Robakis,N.K. (1995) Evidence that secretase cleavage of cell surface Alzheimer amyloid precursor occurs after normal endocytic internalization. *J Neurosci Res* 40(5), 694-706.
- Reid,G., Hubner,M.R., Metivier,R., Brand,H., Denger,S., Manu,D., Beaudouin,J., Ellenberg,J. und Gannon,F. (2003) Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 11(3), 695-707.
- Robyr,D., Wolffe,A.P. und Wahli,W. (2000) Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol* 14(3), 329-347.
- Ruland,J., Sirard,C., Elia,A., MacPherson,D., Wakeham,A., Li,L., de la Pompa,J.L., Cohen,S.N. und Mak,T.W. (2001) p53 accumulation, defective cell proliferation, and early embryonic lethality in mice lacking tsg101. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(4), 1859-1864.
- Saji,S., Okumura,N., Eguchi,H., Nakashima,S., Suzuki,A., Toi,M., Nozawa,Y., Saji,S. und Hayashi,S. (2001) MDM2 enhances the function of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 281(1), 259-265.
- Salghetti,S.E., Muratani,M., Wijnen,H., Futcher,B. und Tansey,W.P. (2000) Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(7), 3118-3123.
- Salghetti,S.E., Caudy,A.A., Chenoweth,J.G. und Tansey,W.P. (2001) Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* 293, 1651-1653.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F. und Maniatis,T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Plainview, New York.
- Schwabe,J.W. und Rhodes,D. (1991) Beyond zinc fingers: steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. *Trends Biochem Sci* 16(8), 291-296.
- Sells,S.F., Han,S.S., Muthukkumar,S., Maddiwar,N., Johnstone,R., Boghaert,E., Gillis,D., Liu,G., Nair,P., Monnig,S., Collini,P., Mattson,M.P., Sukhatme,V.P., Zimmer,S.G., Wood,D.P., McRoberts,J.W., Shi,Y. und Rangnekar,V.M. (1997) Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. *Mol Cell Biol* 17(7), 3823-3832.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A. und Brown, M. (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103(6), 843-852.
- Sobel, A. (1991) Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction? *Trends Biochem* 16(8), 301-305.
- Sun, Z., Pan, J., Buble, G. und Balk, S.P. (1997) Frequent abnormalities of TSG101 transcripts in human prostate cancer. *Oncogene* 15(25), 3121-3125.
- Sun, Z., Pan, J., Hope, W.X., Cohen, S.N. und Balk, S.P. (1999) Tumor susceptibility gene 101 protein represses androgen receptor transactivation and interacts with p300. *Cancer* 86(4), 689-696.
- Svaren, J., Schmitz, J. und Horz, W. (1994) The transactivation domain of Pho4 is required for nucleosome disruption at the PHO5 promoter. *EMBO J* 13(20), 4856-4862.
- Swanson, M.S. und Isberg, R.R. (1996) Identification of *Legionella pneumophila* mutants that have aberrant intracellular fates. *Infect Immun* 64(7), 2585-2594.
- Takizawa, P.A., Sil, A., Swedlow, J.R., Herskowitz, I. und Vale, R.D. (1997) Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* 389(6646), 90-93.
- Takizawa, P.A. und Vale, R.D. (2000) The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(10), 5273-5278.
- Tansey, W.P. (2001) Transcriptional activation: risky business. *Genes Dev* 15, 1045-1050.
- Thomas, T., Voss, A.K., Petrou, P. und Gruss, P. (2000) The murine gene, Traube, is essential for the growth of preimplantation embryos. *Dev Biol* 227(2), 324-342.
- Thomas, D. und Tyers, M. (2000) Transcriptional regulation: kamikaze activators. *Curr Biol* 10(9), 341-343.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. und Pickart, C.M. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19(1), 94-102.
- Tora, L., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Gaub, M.P. und Chambon, P. (1988) The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* 333(6169), 185-188.
- Treier, M., Staszewski, L.M. und Bohmann, D. (1994) Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* 78(5), 787-798.

## 7. Literaturverzeichnis

---

Tumbar,T., Sudlow,G. und Belmont,A.S. (1999) Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *J Cell Biol* 145(7), 1341-1354.

Vegeto,E., Shahbaz,M.M., Wen,D.X., Goldman,M.E., O'Malley,B.W. und McDonnell,D.P. (1993) Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 7(10), 1244-1255.

VerPlank,L., Bouamr,F., LaGrassa,T.J., Agresta,B., Kikonyogo,A., Leis,J. und Carter,C.A. (2001) TSG101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L-domain in HIV type 1 Pr55<sup>Gag</sup>. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(14), 7724-7729.

Villarejo,M.R. und Zabin,I. (1974) Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J Bacteriol* 120(1), 466-474.

Wagner,K.-U., Dierisseau,P., Rucker,E.B., Robinson,G.W. und Hennighausen,L. (1998) Genomic architecture and transcriptional activation of the mouse and human tumor susceptibility gene TSG101: common types of shorter transcripts are true alternative splice variants. *Oncogene* 17, 2761-2770.

Wallace,A.D. und Cidlowski,J.A. (2001) Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem* 276(46), 42714-42721.

Wang,Y., Xiao,L., Thiagalingam,A., Nelkin,B.D. und Casero,R.A. (1998) The identification of a cis-element and a trans-acting factor involved in the response to polyamines and polyamine analogues in the regulation of the human spermidine/spermine N1-acetyltransferase gene transcription. *J Biol Chem* 273(51), 34623-34630.

Wang,Y., Devereux,W., Stewart,T.M. und Casero,R.A. (1999) Cloning and characterization of human polyamine-modulated factor-1, a transcriptional cofactor that regulates the transcription of the spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase gene. *J Biol Chem* 274(31), 22095-22101.

Wang,H., Huang,Z.Q., Xia,L., Feng,Q., Erdjument-Bromage,H., Strahl,B.D., Briggs,S.D., Allis,C.D., Wong,J., Tempst,P. und Zhang,Y. (2001a) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 293(5531), 853-857.

Wang,Y., Devereux,W., Stewart,T.M. und Casero,R.A. (2001b) Characterization of the interaction between the transcription factors human polyamine modulated factor (PMF-1) and NF-E2-related factor 2 (Nrf-2) in the transcriptional regulation of the spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT) gene. *Biochem J* 355, 45-49.

Ward,C.L., Omura,S. und Kopito,R.R. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83(1), 121-127.

## 7. Literaturverzeichnis

---

Watanabe,M., Yanagi,Y., Masuhiro,Y., Yano,T., Yoshikawa,H., Yanagisawa,J. und Kato,S. (1998) A putative tumor suppressor, TSG101, acts as a transcriptional suppressor through its coiled-coil domain. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 900-905.

Xie,W., Li,L. und Cohen,S.N. (1998) Cell cycle-dependent subcellular localization of the TSG101 protein and mitotic and nuclear abnormalities associated with TSG101 deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 1595-1600.

Yang,X.J., Ogryzko,V.V., Nishikawa,J., Howard,B.H. und Nakatani,Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382(6589), 319-324.

Zhang,H.L., Eom,T., Oleynikov,Y., Shenoy,S.M., Liebelt,D.A., Dichtenberg,J.B., Singer,R.H. und Bassell,G.J. (2001) Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* 31(2), 261-275.

Zhong,Q., Chen,Y., Jones,D. und Lee,W.-H. (1998) Perturbation of TSG101 protein affects cell cycle progression. *Cancer Res* 58, 2699-2702.

## **8. Anhang**

### **Publikationen**

Leister,P., Burgdorf,S. und Scheidtmann,K.H. (2003) Apoptosis antagonizing transcription factor AATF is a novel coactivator of nuclear hormone receptors. *Signal Transduction*, in Druck.

Burgdorf,S. und Scheidtmann,K.H. (2003) TSG101 interacts with AATF and enhances AR-mediated transcription by promoting its mono-ubiquitination. *J Biol Chem*, eingereicht zur Publikation.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtmann für die Überlassung des Themas, für die konstruktive Betreuung meiner Arbeit sowie für seine Hilfsbereitschaft bei Problemen jeder Art.

Herrn Priv. Doz. Dr. Otto Traub danke ich sehr für die Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Scheidtmann möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Ein besonderes Dankeschön geht an Gerd Landsberg, der jederzeit ein offenes Ohr für Fragen hatte und immer mit kompetenten Tips zur Seite stand.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie, meiner Frau Dagmar und meinem Sohn Daniel sowie meinen Eltern und Schwiegereltern. Vielen Dank für das gebotene Zuhause, für den liebevollen Umgang und für die Unterstützung jeglicher Art. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, daß diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

Bonn, den 14.07.2003

Sven Burgdorf



## Lebenslauf

Name	Sven Burgdorf, geb. Zawodny	
Geburtsdatum	20.01.76	
Geburtsort	Genk, Belgien	
Familienstand	verheiratet, 1 Kind	
Schulbildung:	1981-1987	Grundschule in Hasselt, Belgien
	1987-1993	Gymnasium in St.-Jozefscollege Hasselt, Belgien
Studium:	1993-1998	„Bio-Ingenieur für Zell- und Genbiotechnologie“ an der Katholischen Universität Leuven, Belgien
	Diplomarbeit	„Analyse von Protein-Protein-Interaktionen im Genom von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durch <i>Two-Hybrid</i> -Analyse.“ Durchführung im Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg. Betreuer: Prof. Dr. G. Volckaert
Berufliche Erfahrungen:	10.98-03.98	Forschungsprojekt im Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, in der Abteilung von Prof. Dr. J. Schell: „Steigerung des Ölgehalts durch Inhibition des Stärkemetabolismus in <i>Brassica napus</i> “ mit einem Stipendium des Rotary Clubs Brühl.
	04.99-05.00	Fortsetzung des Forschungsprojektes „Steigerung des Ölgehalts durch Inhibition des Stärkemetabolismus in <i>Brassica napus</i> “ bei

MPB Cologne GmbH, in weiterem  
Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut  
für Züchtungsforschung, Köln.

Doktorarbeit

seit 06.00

„Isolierung und Charakterisierung von  
Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors  
AATF“ im Institut für Genetik der Rheinischen  
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Bis 12.02  
mit einem Stipendium des Graduiertenkollegs  
„Funktionelle Proteindomänen“.

Betreuer: Prof. Dr. K.H. Scheidtman